

Indlægseddell

Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay (Prognostisk gensignaturanalyse for brystkræft)



Version 05, oprettet 2025-06



2-10 tests

Opbevaringsbetingelser

 -20 °C Opbevares ved -20 °C eller derunder	Prosigna Prognostisk gensignaturanalyse for brystkræft – Cartridge
 -80 °C Opbevares ved -80 °C eller derunder	Prosigna Prognostisk gensignaturanalyse for brystkræft – CodeSet
 +15 °C Skal opbevares ved stuetemperatur	Prosigna Prognostisk gensignaturanalyse for brystkræft – Prep Pack
 +2 °C Opbevares ved +4 °C	Prosigna Prognostisk gensignaturanalyse for brystkræft – Prep Plates

INDHOLD

1	TILSIGTET ANVENDELSE/FORMÅL	1
2	OVERSIGT OVER TESTSYSTEMET	1
2.1	Principper for nCounter-analysesystemet	2
2.2	Principper for Prosigna-algoritmen til outputberegning	2
3	LEVEREDE REAGENSER OG Udstyr	2
3.1	Oversigt over Prosigna-sættet	2
3.2	Indhold i Prosigna-sæt til et Prosigna-sæt med 2, 3, 4 eller 10 test	3
4	ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER	3
5	GENERELLE ANALYSEOVERVEJELSER	3
5.1	Vævsbehandling	3
5.2	Udførelse af Prosigna-analysen	4
6	UDDANNELSESOPLYSNINGER	4
7	SPILDHÅNDTERING	4
8	OPBEVARING OG HÅNDTERING (REAGENSER)	4
9	INSTRUMENTER, DER KRÆVES TIL PROSIGNA	4
10	REAGENSER OG Udstyr, SOM KRÆVES, MEN SOM IKKE ER LEVERET	4
10.1	Materialer	4
10.2	Udstyr	4
10.3	Specifikationer for udstyr	4
11	INDSAMLING OG BEHANDLING AF PRØVER	5
11.1	Krav til vævsprøve og patologievevaluering	5
11.2	Indsamling og opbevaring af prøver	5
11.3	Klargøring af objektglas	5
11.4	Behandling af objektglas	5
11.5	Isolation af RNA	6
11.6	Måling af RNA-koncentrationen og kvalitet	6
11.7	Analyseprocedure	6
13	RESULTATER AF ANALYSEN	9
13.1	Intrinsiske undertyper	9
13.2	ROR-resultat	9
13.3	Sandsynlighed for 10-års distant recidiv	9
13.4	Risikoklassificering	9
13.5	Kvalitetskontrol	9
14	BEGRÆNSNINGER FOR PROCEDURERNE	10
15	FORVENTEDE VÆRDIER	10
15.1	ROR-område efter undertype	10
15.2	Frekvens af ROR-resultat efter nodalstatus	10
15.3	Distant recidivfri overlevelse (DRFS) efter risikokategorisering	11

16	YDELSSESKARAKTERISTIKA	11
16.1	Analytisk præcision og reproducerbarhed	11
16.2	Følsomhed/RNA-input	13
16.3	Interferenstest	13
16.4	Klinisk ydelse	13
17	BIBLIOGRAFI	25
18	SYMBOLER OG DEFINITIONER	26
19	KONTAKTOPLYSNINGER	26

1 TILSIGTET ANVENDELSE/FORMÅL

Prosigna® Prognostisk gensignaturanalyse for brystkræft er en *in vitro*-diagnoseanalyse, der benytter genekspressionsprofilen for celler, der findes i brystkræftvæv, til at vurdere en patients risiko for distant recidiv. Analysen måler genekspressionsprofilen vha. RNA udtrykket fra formalinfikseret, paraffinindlejret (FFPE) brystkræftvæv. Genudtryksdataene vægtes sammen med kliniske variabler for at generere både en undertype (luminal A, luminal B, HER2-beriget eller basal-lignende) og et resultat, der er indikativt for sandsynligheden for distant recidiv af sygdommen. Analysen udføres på nCounter® analysesystem vha. FFPE-brystkræftvæv, der tidligere blev diagnosticeret som invasivt brystcarcinom.

Prosigna Prognostisk gensignaturanalyse for brystkræft er indiceret hos kvindelige brystkræftpatienter, der har fået udført enten mastektomi eller brystbevarende behandling i forbindelse med lokoregional behandling i overensstemmelse med behandlingsstandarderne, enten som:

- En prognostisk indikator for distant recidiv-fri overlevelse ved 10 år hos postklimakterielle kvinder med hormonreceptorpositiv (HR+), lymfenodenegativ, trin I eller II brystkræft til behandling med adjuvant endokrinbehandling alene, når den bruges sammen med andre klinisk-patologiske faktorer.
- En prognostisk indikator for distant recidiv-fri overlevelse ved 10 år hos postklimakterielle kvinder med hormonreceptorpositiv (HR+), lymfenodepositiv (1-3 positive noder, eller 4 eller flere positive noder), trin II eller IIIA brystkræft til behandling med adjuvant endokrinbehandling alene, når den bruges sammen med andre kliniske-patologiske faktorer.

2 OVERSIGT OVER TESTSYSTEMET

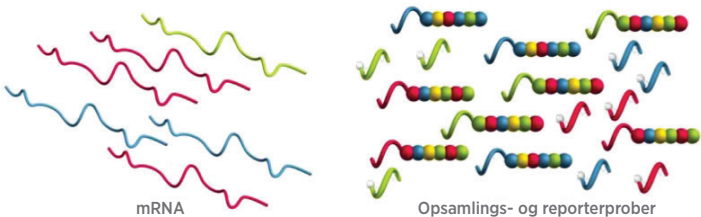
nCounter-analysesystemet leverer direkte, multiplex-målinger af genekspression gennem digitale udlæsninger af den relative rigelige forekomst af mRNA-transkripter vha. følgende trin: 1) hybridisering af RNA med fluorescerende reporter- og opsamlingsprober, 2) rensning af mål-/probekomplekser vha. nCounter-klargøringsplader, der indeholder de nødvendige reagenser for posthybridiseringsbehandling og immobilisering på nCounter-kassette på nCounter-klargøringsstationen, og 3) analyse af nCounter-kassetten på den digitale nCounter-analyseenhed for at opnå et testresultat¹. Både opsamlings- og reporterproberne indeholder unikke DNA-probesekvenser til målhybridisering og rensning. Opsamlings- og reporterproberne kombineres med positive og negative kontroller og danner CodeSet[®]et. Prosigna måler samtidigt ekspressionsniveauerne af 50 gener, der bruges til den intrinsiske algoritme til klassificering af undertype², 8 husholdningsgener bruges til signalnormalisering, 6 positive kontroller og 8 negative kontroller i en enkelt hybridiseringsreaktion, der bruger nukleinsyreprober, der er specifikt designet til de pågældende gener. Med Prosigna-sættet medfølger også en referenceprøve bestående af *in vitro* transkriberede RNA-mål for hver af de 58 gener. Referenceprøven er testet med hver batch patient-RNA-prøver for at kvalificere forløbet og normalisere signalet fra hvert gen.

Prosigna-analysen udføres på RNA, der er isoleret fra FFPE-brystkræftvæv. En patolog undersøger et objektglas, der er farvet med hæmatoxylin og eosin (H&E), og identificerer (og markerer) det område med invasivt brystcarcinom, som er egnet til testen. Patologen måler også tumorens overfladeområde, hvilket bestemmer antallet af ikke-farvede objektglas, der kræves til testen, og tumorcellulariteten for at sikre tilstedeværelsen af tilstrækkelig tumorvæv til testen. En uddannet tekniker makrodissekerer området på de ikke-farvede objektglas i henhold til det markerede tumorområde på det H&E-farvede objektglas og isolerer RNA fra vævet. Det isolerede RNA testes derefter på nCounter-analysesystemet for at opnå testresultater, herunder den intrinsiske undertype, recidivrisikoresultat (ROR) og risikokategori.

2.1 Principper for nCounter-analysesystemet

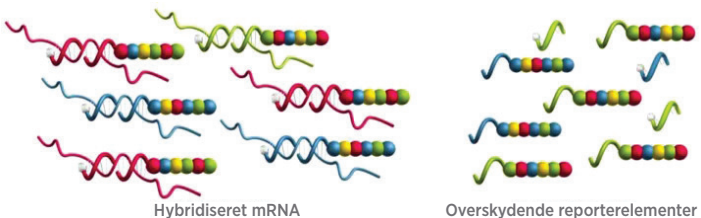
nCounter-analysesystemet benytter genspecifikke genpar (Figur 1), der hybridiseres direkte med mRNA-prøven i opløsning, hvilket eliminerer enzymatiske reaktioner, der kunne introducere bias i resultaterne. I første trin af analysen hybridiseres DNA-proberne direkte til et område af RNA-prøven i opløsning med 70-100 basispar. Den fluorescerende reporter-probe består af en sekvens på 35-50 basisprober, som er kompletterende for mRNA-målet, og en unik DNA-grundstruktur, der hybridiseres til seks RNA-segmenter, der er mærket med én af fire fluorescerende farvestoffer; rød (R), gul (Y), blå (B) eller grøn (G). De fluorescerende segmenter danner en seks-position/4-farve fluorescerende "farvekode", der er unik for hvert mål. En separat opsamlingsprobe består af en sekvens med 35-50 basisprober, som er kompletterende for mRNA-målet, og biotin, der bruges til immobilisering på et streptavidin-belagt objektglas.

Figur 1: Hybridisering af CodeSet med mRNA



Efter hybridisering udføres alle prøverensningstrin automatisk på nCounter-klargøringsstationen. Først fjernes overskydende opsamlings- og reporter-prober (Figur 2) vha. efterfølgende opsamlingstrin med magnetiske kugler efterfulgt af binding af probe-målkomplekserne på tilfældige placeringer på overfladen af nCounter-Kassetten via en streptavidin-biotin-kobling (Figur 3). Endeligt justeres og immobiliseres probe/målkomplekser (Figur 4) i nCounter-kassetten.

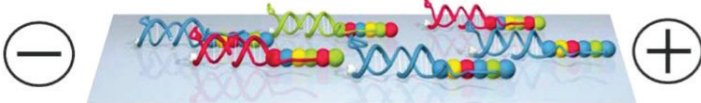
Figur 2: Fjern overskydende reporter-elementer



Figur 3: Bind hybridiserede reporter-elementer til kassetten overflade



Figur 4: Justering og immobilisering af hybridiserede reporter-elementer



Efter fuldførelse af prøvebehandlingen placeres Kassetten i nCounter Digital analyseenhed til dataindsamling. Hvert målmolekyle af interesse er identificeret med en "farvekode", der er genereret af seks arrangerede fluorescerende pletter, der findes på molekylens reporter-probe. Reporter-proberne på Kassetten overflade tælles og tabuleres derefter for hvert målmolekyle og behandles med algoritmen (Figur 5).

Figur 5: Dataindsamling

Kode	Gen	Antal
	x	3
	y	1
	z	2

2.2 Principper for Prosigna-algoritmen til outputberegning

Testen er baseret på den rapporterede 50-gens klassificeringsalgoritme, der oprindeligt blev kaldt PAM50², og udføres på nCounter-analysesystemet vha. RHA, der er udtrukket fra formalinfikerede, paraaffinindlejrede (FFPE) brystkræftvævsprøver. Algoritmen benytter en 50-gens ekspressionsprofil til at tildele brystkræft til én af fire molekylære klasser eller intrinsiske undertyper: Luminal A, Luminal B, HER2-beriget eller Basal-lignende². De prototypiske genekspressionsprofiler (f.eks. geometrisk tyngdepunkt) for de fire intrinsiske undertyper blev opnået på nCounter-analysesystemet vha. FFPE-brystkræftprøver, der blev indsamlet fra flere kliniske steder i Nordamerika. Efter udførelse af analysen på en patienttestprøve sammenligner en beregningsalgoritme, der er baseret på en Pearsons korrelation, den normaliserede 50-gens ekspressionsprofil for patienttestprøven med de prototypiske ekspressionsprofiler for de fire intrinsiske undertyper af brystkræft. Patienttestprøven tildeles undertypen med den højeste Pearsons korrelation.

Algoritmen rapporterer endvidere et recidivrisikoresultat (ROR) på en skala fra 0-100³, hvilket korreleres med sandsynligheden for distant recidiv ved 10 år hos postklimatektiske kvinder med hormonreceptorpositiv brystkræft i en tidlig fase⁴. Rapporten angiver også en risikokategori (lav, mellem eller høj). ROR-resultatet beregnes vha. koefficienter fra en Cox-model, der omfatter Pearson-korrelationen for et 46-gens undersæt af de 50 gener med hver intrinsisk undertypes geometriske tyngdepunkt, et spredningsresultat og samlet tumorstørrelse. Testvariablerne multipliceres med de tilsvarende koefficienter fra Cox-modellen for at generere resultatet, der derefter justeres til en 0-100 skala, der er baseret på koefficienter, der er genereret ud fra træningssættet for FFPE-brystkræftprøver. Risikokategorier rapporteres også baseret på afskæring for ROR bestemt i en klinisk valideringsundersøgelse.

3 LEVEREDE REAGENSER OG UDSTYR

3.1 Oversigt over Prosigna-sættet

Prosigna-sættet indeholder tilstrækkelige reagenser til at behandle 2, 3, 4, eller 10 patientprøver, afhængigt af det bestilte produkt. Du finder bestillingsoplysninger nedenfor. Prosigna-sættet indeholder et CodeSet, ét referenceprøvevær for hvert sæt på 2 til 10 test og forbrugsvarekomponenter, hvis ydelse testes sammen før frigivelse.

Katalognummer	Antal test i sættet	Rør med referenceprøver inkluderet
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Anbefalet til brug sammen med Veracyte FFPE RNA-ekstraktionssættet (550100). RNA-ekstraktionssættet er kun tilgængeligt gennem Veracyte.

3.2 Indhold i Prosigna-sæt til et Prosigna-sæt med 2, 3, 4 eller 10 test

Antal test	2	3	4	10
Æske med Prosigna CodeSet				
Prosigna Reporter-CodeSet	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL	1 x 65 µL
Prosigna Opsamlings-ProbeSet	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL	1 x 70 µL
Prosigna RNA-referenceprøve	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL
CodeSet-stregkodeetiket	1	1	1	1
Testkonfigurationskode	1	1	1	1
Æske med Prosigna-klargøringsplader				
Klargøringsplader	1	1	1	2
Æske med Prosigna-kassette				
nCounter-kassetter	1	1	1	1
Prosigna-klargøringspakke, æske				
Spidser til nCounter-klargøringsstation	1	1	1	1
Klæbeovertræk til nCounter-kassette	2	2	2	2
nCounter-spidsvertræk	2	2	2	2
nCounter-hybridiseringsbuffer	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL
Rørstrimler med hakker, 12-brønde	4	4	4	4
Låg til rørstrimler med hakker, 12 brønde	4	4	4	4

Beskrivelse af indholdet

Prosigna-CodeSet

Prosigna-CodeSet *buffer, nukleinsyrer med fluorescerende farvestoffer*

Prosigna Opsamlings-ProbeSet *buffer, nukleinsyrer*

Prosigna RNA-referenceprøve *buffer, nukleinsyrer*

CodeSet-stregkodeetiketter *klistermærkeark*

Testkonfigurationskode *klistermærkekort*

Prosigna-klargøringsplader

Klargøringsplader *superparamagnetiske beads, buffer, salte, oligonukleotider, polystyrenbeads med fluorescerende farvestoffer*

Prosigna-kassetter

nCounter-kassetter *prøvekassette(r)*

Prosigna-klargøringspakke

nCounter-hybridiseringsbuffer *buffer, salte*
Rørstrimler med hakker, 12-brønde *plaststrimler*
Låg til rørstrimler med hakker, 12-brønde *plastlåg*
Spidser til nCounter-klargøringsstation *2 racks med 90 spidser + 6 nCounter-spyd*
Klæbeovertræk til nCounter-kassette *klæbefilm*
nCounter-spidsvertræk *6-brønds spids-holdere*

4 ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

1. Til *in vitro*-diagnostisk brug.
2. Denne analyse skal køres af operatører, der er uddannet i stærkt komplekse molekylærbiologiteknikker, og i overensstemmelse med lokale bestemmelser.
3. Bland ikke komponenter af sæt på tværs af Prosigna-partier. Funktionen kan kun garanteres for Prosigna-partier, som de er leveret, da de kvalificeres på denne måde under produktionen.
4. Enhver resterende reagens må ikke genbruges i Prosigna-analysen.
5. Kassér alle reaktioner med kompromitterede hybridiseringstider eller -temperaturer.
6. Det er vigtigt at bevare integriteten af prøvens sporbarhed (væv til RNA og NA til analyse) for at sikre, at patientprøve-id'et er knyttet til det rigtige testresultat.
7. Hvis reagenser ikke opbevares under de betingelser, der er angivet på etiketten, kunne det påvirke analysens ydelse negativt.
8. Bær altid handsker ved håndtering af reagenser og prøver.
9. Undgå RNase-kontamination, hvilket kan påvirke kvaliteten af resultaterne negativt.

10. Alle biologiske prøver og materialer skal håndteres, som om der består en potentiel risiko for overførelse af smitsomme stoffer, og skal kasseres under passende forholdsregler i overensstemmelse med nationale og lokale bestemmelser.
11. Pipettér aldrig via mund.
12. Undgå kontakt mellem reagens og øjne, hud og slimhinder.
13. Brug bedste fremgangsmåder for molekylærbiologiske laboratorier til at forhindre krydskontamination mellem testprøver og eller med højkoncentrerede nukleinsyremål (syntetiske eller PCR-forstærkede), hvilket kan påvirke kvaliteten af resultaterne negativt.
14. Meget lave niveauer af natriumazid (<0,1 %) findes efter processen i Prosigna-klargøringsplader og nCounter-kassetter. Der anbefales derfor, at der bruges spildbeholdere af plastik (og ikke metal) til bortskaffelse. Selvom det er ekstremt usandsynligt for Prosigna, vides det, at akkumulering af natriumazid på metal udgør en eksplosionsfare.
15. Der findes yderligere instrumentspecifikke bortskaffelsesoplysninger i brugervejledningen til nCounter-analysesystemet og servicevejledningen til klargøringsstationen og den digitale analyseenhed.
16. Der kan findes MSDS-ark (materiale sikkerhedsdataark) for reporter-CodeSet, opsamlings-ProbeSet, hybridiseringsbuffer og klargøringsplader på www.prosigna.com.
17. Alle farlige materialer skal bortskaffes i henhold til institutionens retningslinjer for bortskaffelse af farligt affald.
18. Alle ubrugte CodeSet skal kasseres.
19. Hvis en patients tumorstørrelseskategori indtastes forkert i softwaren, kan ROR-resultatet og risikoklassifikationen påvirkes negativt (f.eks. ændret ROR-resultat og/eller forkert klassificering).
20. Hvis en patients nodalstatus indtastes forkert i softwaren, kan patientens testresultater blive rapporteret forkert (f.eks. forkert risikoklassificering).
21. Brug ikke RNA af utilstrækkelig kvalitet eller kvantitet eller tumorprøver med utilstrækkelig tumoroverfladeområde eller-cellularitet i Prosigna-analysen. Prosigna-analysen kan muligvis ikke give et gyldigt resultat og vil i stedet rapportere en analysefejl.

5 GENERELLE ANALYSEOVERVEJELSER

1. Analysen er udelukkende beregnet til brug på formalinfikserede, paraffinindlejrede (FFPE) prøver af brystkræftvæv fra kirurgisk resektion. Den er ikke beregnet til brug på frisk eller frosset væv eller på ikke-brystkræftvæv.
2. Den samlede størrelse af en patients primære tumor og nodalstatus kræves for at gennemføre analysen.
3. Brug sterile mikropipettespidser til engangsbrug for at undgå mikrobiel kontamination og nukleasekontamination af reagenser eller prøver under behandling.
4. Opbevar de isolerede RNA-prøver på våd is, når de ikke manipuleres aktivt.
5. Kalibrerede termometre er påkrævet til varmeeenhedsblokke.
6. Brug ikke sætkomponenter, hvis de ankommer i beskadiget stand.
7. Der anbefales, at der udvikles og anvendes kliniske kontroller (f.eks. for risikokategori) af laboratorier, der kører Prosigna, for at sikre nøjagtigheden af resultater over tid som del af standardprocedurer til kvalitetskontrol på laboratoriet.

5.1 Vævsbehandling

1. Hvis omgivende ikke-tumor/normalt væv ikke fjernes korrekt vha. makrodissektion under vævsbehandling, kunne det føre til en undervurdering af risikoen, fordi der rapporteres et lavere ROR-resultat til lægen.
2. Hvis humant genomisk DNA ikke fjernes korrekt under RNA-isolering, kan det føre til en højere fejlfrekvens på grund af lavere analysesignal eller en overvurdering af risikoen, fordi der rapporteres et højere ROR-resultat til lægen.
3. Alle ikke-farvede vævsektioner skal monteres på positivt ladede mikroskopobjektglas for at undgå løsning under vævsbehandling.
4. Ved prøver, der kræver flere objektglas, skal alle objektglas behandles sammen.
5. Vævssektioner, der er monteret på objektglas, kan blive forringede, hvis de opbevares i mere end 9 måneder i et udtørret miljø.
6. Udskift den 3 % glycerolarbejdsopløsning hver uge, eller hvis opløsningen bliver grumset, for at undgå kontamination.

- Skift indholdet af den første D-Limonene-vask efter behandling af 4 objektglassæt og indholdet af ethanol (EtOH) og indholdet i den anden D-Limonene-farvningssskål efter behandling af 8 objektglassæt for at undgå at kompromittere vævskvaliteten.
- Vær forsigtig, når du markerer tumorområdet på det ikke-farvede objektglas og fjerner ikke-tumorfæve, for at sikre, at tumorfævet ikke forstyrres.
- Håndter skarpe instrumenter forsigtigt under makrodissektion.
- Brug et helt nyt barbarblad for hver vævsprøve, der behandles.
- Nye partier/batches af RNA-isolationssæt skal testes mod specifikationerne for isolationssættet for at kvalificere de nye sætparti til patienttest (se afsnit 11.5 for at få flere oplysninger).

5.2 Udførelse af Prosigna-analysen

- Kontrollér, at patientens kategorimæssige primære samlede tumorstørrelse er indtastet korrekt i softwaren.
- Kontrollér, at patientens kategorimæssige nodalstørrelse er indtastet korrekt i softwaren.
- Kontrollér, at varmeklokken med opvarmet låg, der kræves til hybridisering, opfylder specifikationerne og kalibreres rutinemæssigt.
- Brug udelukkende de forbrugsvarer, der blev leveret med Prosigna-sættet. De er designet specifikt til at fungere med nCounter-klargøringsstationen og nCounter Digital analyseenhed.
- Hvis hybridiseringsbufferen er blevet opbevaret ved kolde temperaturer, og der bemærkes udfældning, skal rørene opvarmes ved 37 °C, indtil saltene er opløst.
- Hvirvelbland ikke analysekomponenter med stor energi for at blande dem, da det kan beskadige reagenserne. Blanding skal udføres vha. en pipette.
- Centrifuger ikke reporter-CodeSet hurtigere end $3.000 \times g$ i mere end 10 sekunder. Brug ikke "impuls"-indstillingen til centrifugeringen. Hvis det gøres, kan det udfælde CodeSet'et.
- Bevar hybridiseringsreaktioner ved 65 °C, indtil de er klar til at blive overført til klargøringsstationen. Hvis varmeklokken indstilles til at reducere gradvist ned til 4 °C eller placere prøver på is ved afslutning af hybridiseringen kunne føre til kryds-hybridisering, hvilket kan kompromittere analyseresultaterne.
- Hvis rørstrimlerne ikke placeres ved 65 °C inden for 15 minutter fra tilføjelse af opsamlings-ProbeSet, kan det føre til krydshybridisering, hvilket kan kompromittere analyseresultaterne.
- Hvis behandlingen på klargøringsstationen ikke startes inden for 15 minutter fra fjernelse af prøverne fra 65 °C, kan det føre til krydshybridisering, hvilket kan kompromittere analyseresultaterne.
- Kontrollér, at rørstrimmellågene sidder godt fast før hybridisering i varmeklokkene for at undgå fordampning, hvilket kan kompromittere analyseresultaterne.

6 UDDANNELSESOPLYSNINGER

Denne analyse skal køres af højt erfarne operatører, der er uddannet i stærkt komplekse molekylærbiologiteknikker, på grundlag af lokale bestemmelser. Kontakt Veracyte for at få uddannelsesoplysninger, der specifikt angår kørsel af Prosigna-analysen.

7 SPILDHÅNDTERING

Se brugervejledningen til nCounter-analysesystemet for at få oplysninger om håndtering af spild, som er specifik for reagenser og instrumenter til brug med IVD-anvendelser.

Se brugsanvisningen til det valgte RNA-ekstraktionssæt for oplysninger om håndtering af spild og oplysninger, som gælder specifikt for RNA-ekstraktionsreagenserne.

8 OPBEVARING OG HÅNDTERING (REAGENSER)

Udløbsdatoen for alle komponenter i analysesæt er angivet på den stregkodeetiket, der leveres med CodeSet-boksen, samt på den udvendige boks mærkning for alle Prosigna-komponenter.

- Komponenter i Prosigna CodeSet-boksen (Prosigna reporter-CodeSet, Prosigna opsamlings-ProbeSet og Prosigna RNA-referenceprøve) skal opbevares ved -80 °C eller derunder.
- nCounter-kassetterne skal opbevares ved eller under -20 °C.
- nCounter-klargøringspladerne skal opbevares ved eller under 4 °C (2-8 °C).
- Komponenterne i nCounter-klargøringspakken skal opbevares ved stuetemperatur 15 °C-25 °C.

9 INSTRUMENTER, DER KRÆVES TIL PROSIGNA

- nCounter-analysesystem (katalognummer NCT-SYST-DX) (omfatter begge instrumenterne nedenfor)
 - nCounter-klargøringsstation 5s (katalognummer NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - nCounter Digital analyseenhed 5s (katalognummer NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX)

Se brugervejledningen til nCounter-analysesystemet for at få flere oplysninger.

10 REAGENSER OG UDSTYR, SOM KRÆVES, MEN SOM IKKE ER LEVERET

10.1 Materialer

- FFPE RNA-isoleringssæt (se kravene til isoleringssæt i afsnit 11.5, hvis du ikke bruger Veracyte FFPE RNA-ekstraktionssæt købt gennem Veracyte).
- Hæmatoxylin og eosin (H&E)
- Positivt ladede objektglas til mikroskop
- D-Limonene-klaringsmiddel (histologiklasse)
- 100 % ethanol (absolut), ACS-klasse eller tilsvarende (ikke mindre end 99,5 %)
- Glycerol, molekylærbiologiklasse
- Nuklease-frit vand, molekylærbiologiklasse*
- 100 % isopropanol*
- Konisk rør 50 mL
- Barbarblade (eller engangsskalpeller)
- Mikrotom-blade til engangsbrug
- 1,5 eller 1,7 mL klæbefri RNase-fri mikrocentrifugerør
- RNase-fri mikropipettespidser med aerosolbarriere

* Nødvendige materialer, som ikke leveres til RNA-ekstraktion ved hjælp af Veracyte FFPE RNA-ekstraktionssæt

10.2 Udstyr

- Mikrotom
- Vandbad (40 °C)
- Objektglasvarmer (45 °C)
- Tørrestativ til mikroskopobjektglas
- Mikropipetter; 2 µL, 20 µL, 200 µL og 1000 µL
- Mini-centrifuge med en 0,2 mL rørstrimmelrotor og standard- rotor til 1,5/2,0 mL mikrocentrifugerør.
- Standard bordplademikrocentrifuge med fastvinklet rotor, der passer til 1,5 mL centrifugerør.
- Rektangulære glasfarvningssskåle med dække (anslået indvendig diameter på 91 x 71 x 60 mm). Der kræves et antal på 3.
- Objektglasstativer (kan indeholde op til 10 75 x 25 mm objektglas)
- Tør varmeklok, stationær*
- Bordpladevortexmikser til mikrocentrifugerør
- Gradueret cylinder (foreslået størrelse: 100-250 mL)
- Dissektionsnål eller pincet med dækglass (vinklet, ikke-savtakket)
- Kalibrerede termometre (dækkende området 55 °C til og med 80 °C)
- UV/Vis-spektrofotometer med mikrovolumen (se specifikationer nedenfor)
- Varmeblok med opvarmet låg (se specifikationer nedenfor)
- Centrifuge med mikropladeadapter til plade (se specifikationer nedenfor)
- Coplin-krukke

* Nødvendigt udstyr til RNA-ekstraktion med Veracyte FFPE RNA-ekstraktionssæt.

10.3 Specifikationer for udstyr

Tabel 1: Fuldspektrum UV/Vis-spektrofotometer med mikrovolumen til kvantificering af nukleinsyre

Designfunktion	Specifikationer
Prøvevolumenområde	1-2 µL
Stilælængde	1 mm
Bølgelængdeområde	260-280 nm
Bølgelængdenøjagtighed eller fejl	± 1 nm
Spektral opløsning eller båndbredde	Mindre end eller lig med 4 nm
Absorberingspræcision eller tilfældig fotometrisk fejl	0,003 (1 mm sti)
Detektionsgrænse	5 ng/µL RNA
Maksimal koncentration	≥ 1000 ng/µL RNA

Tabel 2: Fotodiode UV/Vis-spektrofotometer med mikrovolumen til kvantificering af nukleinsyre

Designfunktion	Specifikationer
Prøvevolumenområde	1-2 µL
Stilængde	0,5 mm
Bølgelængdeområde	260 og 280 nm
Spektral opløsning	Mindre end eller lig med 8 nm
Absorberingsnøjagtighed	3 % (ved 1,05 Abs ved 260 nm)
Detektionsgrænse	4 ng/µL RNA
Maksimal koncentration	≥ 1000 ng/µL RNA

Tabel 3: Varmeblok med opvarmet låg til analysehybridisering

Designfunktion	Specifikationer
Varmeblokdesign	- Skal passe almindelig profil, 12 × 0,2 mL tilpassede rørstrimler, der er leveret som del af nCounter-klargøringspakken. - Varmeblokke, der er designet til rør med lav profil (LP) og høj profil (HP), er ikke kompatible (kaldes også "hurtige" blokke til temperaturskiftebelastning). - Varmeblokke, der er designet til andre typer rør (f.eks. 0,1 mL rør, 1,5 mL rør), er ikke kompatible. - Skal kunne programmeres til at holde en temperatur på 65 °C. - Skal holde en temperatur inden for ±1 °C af 65 °C.
Design af opvarmet låg	- Låg med fast eller justerbar højde er acceptable. - Låg skal kunne programmeres til 70 °C

Tabel 4: Centrifuge med mikropladebærere til centrifugering af nCounter-klargøringsplader

Designfunktion	Specifikationer
Centrifugeringshastighed	Minimum 2000 × g
Rotorer	4 × 750 mL udsvingsrotorer med mikropladebærere (eller tilsvarende), der rummer SBS-format 96-brønds mikroplader
Tilstande	Accelerations-/decelerationstilstande

11 INDSAMLING OG BEHANDLING AF PRØVER

11.1 Krav til vævsprøve og patologicvaluering

- Prosigna prognostisk gensignaturanalyse for brystkræft bør udføres på en prøve af formalinfikseret, paraffinindlejret (FFPE) hormonreceptorpositivt brystkræftvæv, som er yderligere specificeret af en patolog som én af følgende typer invasivt brystkarcinom:
 - Invasivt duktalt karcinom
 - Invasivt lobulært karcinom
 - Invasivt karcinom med duktalet og lobulære egenskaber ("karcinom af blandet type")
 - Ingen speciel type (NST) eller ikke specificeret på anden vis (NOS)
- En patolog skal vælge den FFPE-tumorblok, der har det største område med levedygtigt invasivt brystkarcinom til denne test.
- Testen kræver vævssektioner, der er monteret på ikke-farvede objektglas, til behandling og et tilsvarende H&E-farvet objektglas fra FFPE-tumorblokken.
- Der anbefales, at vævssektioner til analysebehandling skæres kontinuerligt med den vævssektion, der blev skåret til H&E-farvning, for at sikre, at det tumorområde, der blev identificeret på det H&E-farvede objektglas, er repræsentativt for tumorområdet på de ikke-farvede objektglas.
- En patolog skal indcirkle området med levedygtigt invasivt brystkarcinom på H&E-objektglasset og udelukke omgivende ikke-tumurvæv.
- En patolog eller uddannet laboratortekniker skal anslå tumorcellulariteten og tumorens overfladeområde inden for det indcirklede område på det H&E-farvede objektglas.
 - Procentdelen af tumorcellularitet på det H&E-farvede objektglas skal være ≥ 10 %
 - Det indcirklede tumoroverfladeområde på det H&E-farvede objektglas skal være ≥ 4 mm²

*Bemærk, at tumorcellularitetsprocenten henviser til procentdelen af levedygtige tumorceller inden for det cirkelmarkerede tumorområde.

- Et samlet tumoroverfladeområde over 100 mm² anbefales som input til testen. I følgende tabel illustreres det anbefalede antal objektglas på grundlag af det målte tumoroverfladeområde på det H&E-farvede objektglas.
- Hvis vævssektionsprocessen viser, at tumorblokken har utilstrækkelig tumorområde eller utilstrækkelig tumorcellularitet, kan en anden blok fra samme tumor evalueres. Hvis der ikke er nogen FFPE-blokke, der indeholder tilstrækkeligt tumurvæv, bør Prosigna-analysen ikke køres. Bemærk, at for tumorblokke med mindre end 20 mm² overfladeområde, er det mere sandsynligt, at RNA-inputkravene ikke vil blive opfyldt.

Tabel 5: Anbefalede krav til objektglas baseret på tumoroverfladeområde

Målt tumoroverfladeområde på H&E-farvet objektglas (mm ²)	Antal ikke-farvede objektglas
4-19	6
20-99	3
≥ 100	1

11.2 Indsamling og opbevaring af prøver

- Følgende kan udføres i henhold til laboratoriets standarddriftsprocedurer: vævsindsamling og formalinfiksering, håndtering og opbevaring af FFPE-tumorblok og forsendelse af FFPE-væv monteret på objektglas.
- FFPE-vævssektioner monteret på objektglas skal opbevares iht. laboratoriets standarddriftsprocedurer. Hvis de opbevares i længere perioder (>30 dage), skal objektglassene opbevares i et udtørret miljø og behandles inden for 9 måneder for at sikre kvaliteten af testresultaterne.

11.3 Klargøring af objektglas

- Brug en mikrotom, og skær et 4-5 µm tykt udsnit til H&E-farvning.
- Brug en mikrotom, og skær et 10 µm tykt udsnit til brug i Prosigna-analysen.
- Placer sektionerne i et vandbad ved 40 °C.
- Monter sektionerne på positivt ladede mikroskopobjektglas.
- Lad objektglassene tørre.
- Bag objektglassene natten over ved 45 °C.

11.4 Behandling af objektglas

- Forbered en arbejdsopløsning på 3 % glycerol ved at blande 1,5 mL glycerol med 48,5 mL nuklease-frit vand i molekylærklasse; skalér efter behov. Hæld opløsningen i en Coplin-krukke til behandling af objektglas.
- Hæld ca. 200-250 mL D-Limonene-klaringsmiddel i to farvningssskåle, mens der sikres, at objektglassene i objektglasstativet vil være komplet nedsænket.
- Hæld ca. 200-250 mL absolut ethanol (EtOH) i en tredje farvningssskål.
- Placer de(n) ikke-farvede, objektglasmonterede vævssektion(er) på et objektglasstativ.
- Placer objektglasstativet i den første farvningssskål med D-Limonene, og ryst forsigtigt objektglasstativet frem og tilbage i 10-15 sekunder. Lad stativet blive stående i den første farvningssskål med D-Limonene i samlet 2 minutter.
- Flyt objektglasstativet fra den første farvningssskål med D-Limonene til den anden skål med D-Limonene. Ryst forsigtigt objektglasstativet frem og tilbage i 10-15 sekunder. Lad stativet blive stående i den anden farvningssskål med D-Limonene i samlet 2 minutter. Sørg for, at al paraffinen er fjernet. Hvis ikke, skal stativet blive stående i den anden farvningssskål med D-Limonene ca. 1 minut længere.
- Flyt objektglasstativet fra den anden farvningssskål med D-Limonene til EtOH-vasken. Ryst forsigtigt objektglasstativet frem og tilbage i 10-15 sekunder, og tag det ud efter 2 minutter.
- Lad objektglassene lufttørre i 5-10 minutter, eller indtil de er helt tørre, og vævet fremstår som hvidt (dette kan tage længere afhængigt af størrelsen af vævet).
- Markér tumorområdet på bagsiden af det ikke-farvede objektglas ved at justere det med det tilsvarende H&E-farvede objektglas og transponere det markerede område.
- Arbejd med ét objektglas ad gangen, og rehydrér vævet på det markerede ikke-farvede objektglas ved at dyppe det i den 3 % glycerolopløsning.
- Fjern overskydende glycerol fra objektglasset vha. en laboratorieserviet.

- Når der behandles flere objektglas, kan brugeren lade objektglassene tørre på et tørrestativ, mens de andre objektglas rehydreres.
- Skrab evt. ikke-tumorstof omkring det markerede tumorområde af med et barberblad eller en skalpel, og kassér det.
- Mens du holder i den ene ende af objektglasset og hviler den anden ende på en fast overflade i en vinkel på 45 grader, skal du opsamle det makrodissekerede tumorstof på kanten af et barberblad. Vævet skulle let "rulle sig op på" barberbladet, mens det opsamles.
- Gentag det forrige trin for hvert objektglas fra samme prøve.
Bemærk: Flere ikke-farvede objektglas fra en enkelt FFPE-prøve kan opsamles på samme barberblad.
- Før forsigtigt vævssektionerne fra samme prøve ind i et mærket 1,5 mL mikrocentrifugerør.
- Hvis der er brugt dissektionsnål eller pincet, skal denne rengøres ved at dyppe den i D-Limonene i et par sekunder og lade den tørre mellem vævsprøver.

11.5 Isolation af RNA

Veracyte anbefaler, at Veracyte FFPE RNA-ekstraktionssættet, som er valideret specifikt til brug med Prosigna, bruges.

Der kan bruges andre RNA-isoleringssæt til at klargøre prøver til Prosigna, hvis de giver RNA fra FFPE-brystkræftvæv monteret på objektglas, som opfylder følgende specifikationer:

Tabel 6: Specifikationer for RNA-isoleringssæt

Metrisk	Test eller måling	Specifikation
RNA-koncentration	Optisk tæthed ved 260 nm	$\geq 12,5$ ng/ μ L
Samlet RNA-volumen (μ L)	Samlet eluerede volumen	≥ 12 μ L
RNA-renhed	Forhold mellem optisk tæthed ved 260 nm og optisk tæthed ved 280 nm (OD 260/280 nm)	1,7-2,3
DNA-kontamination	Genomisk DNA-indhold af elueret RNA-prøve	≤ 1 ng/ μ L
RNA-integritet	Størrelsesfordeling af de isolerede RNA-fragmenter	≥ 90 % af de isolerede RNA-fragmenter skal være >100 nukleotider i længde

Forsigtig: Hvis der anvendes en alternativ isolationsprocedure i kombination med Prosigna-analysen, skal dette særlige workflow valideres fuldt ud af laboratoriet, før det implementeres rutinemæssigt.

RNA-isoleringsprocedure:

- Hvis Veracyte FFPE RNA-ekstraktionssættet anvendes, følges brugsanvisningen, som er leveret af Veracyte.
- Hvis en alternativ ekstraktionsmetode anvendes, følges den validerede protokol eller den protokol, som er givet af producenten.

Hvert parti RNA-ekstraktionssæt, som er fremstillet af Veracyte, er kvalificeret til at producere RNA-prøver, som opfylder de på forhånd definerede specifikationer for diagnostiske genekspressionsanalyser. Der henvises til det valgte RNA-ekstraktionssæts metodeark/brugsanvisning for oplysninger om korrekt opbevaring, sikkerhed og håndtering.

11.6 Måling af RNA-koncentrationen og kvalitet

- Mål koncentrationen af den isolerede RNA inden for samme arbejdsdag (opbevar ved $+2$ to $+8$ °C), eller frys ved -70 °C eller derunder indtil brug.
- Mål den optiske tæthed (OD) ved 260 og 280 nm af 2 μ L af den isolerede RNA vha. et spektrofotometer, der opfylder de specifikationer, der er angivet i afsnittet 10.3 Specifikationer for udstyr. Undgå at pipettere volumen på 2 μ L fra bunden af kilderøret i tilfælde af, at der stadig findes glasfibre, da disse vil forstyrre aflæsningen af optisk tæthed.
- Følg instruktionerne for måling af RNA fra producenten af spektrofotometeret.
- Hvis en prøve ikke opfylder den minimale RNA-renhed eller koncentrationsmetrik (Tabel 6), skal du centrifugere prøverøret i 1 minut ved maksimal hastighed ($>10.000 \times g$), placere røret på is og gentage måleprocessen. Hvis prøven stadig ikke opfylder enten renheds- eller koncentrationsmetrikken, er RNA-prøven ikke egnet til analyse vha. Prosigna-analyseproceduren. Brug ikke RNA af utilstrækkelig kvalitet eller kvantitet i Prosigna-analysen.
- RNA-udtrækningen kan gentages, hvis specifikationer for minimal koncentration eller minimal renhed ikke er opfyldt (Tabel 6). Brugere kan vælge at isolere yderligere objektglas fra samme FFPE-blok eller vælge en separat blok fra samme patient.

- Hvis RNA-koncentrationen overstiger 250 ng/ μ L, skal den fortyndes med RNase- og DNase-fri vand i molelylærklasse til en målkoncentration på 200 ng/ μ L før udførelse af den efterfølgende hybridiseringsanalyse. Brug det registrerede resultat for OD 260/280-forhold fra den ufortyndede prøve til at bestemme, om den fortyndede prøve opfylder den minimale RNA-renhed på 1,7.
- Frys RNA ved -70 °C eller derunder, hvis Prosigna-analysen ikke kan fuldføres inden for samme arbejdsdag.

11.7 Analyseprocedure

Denne analyseprocedure beskriver de trin, der er nødvendige for at udføre Prosigna-analysen vha. nCounter-analysesystemet. Disse trin kan opsummeres i følgende kategorier på to på hinanden følgende dage:

Første dag

- Konfigurer kørselssæt-id-posten (RSID) i webprogrammet
- Konfiguration af RNA-hybridisering med Prosigna CodeSet (30 minut konfiguration, 15-21 timers hybridisering)

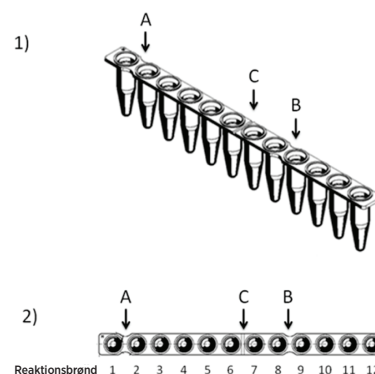
Anden dag

- Konfiguration og kørsel af klargøringsstation (20 minutters konfiguration, 2-3 timer pr. kørsel afhængigt af antallet af kørte prøver)
- Konfiguration og scanning af Kasette på den digitale analyseenhed (5 minutter til konfiguration, 2,5 - 4,5 timer for hver Kasette, afhængigt af antallet af kørte prøver)
- Hentning af rapport (30 minutter)

Valg af patientprøve og batchkonfiguration

- Bestem de patientprøver, der skal bruges i testkørslen. Der kan inkluderes op til 10 prøver i en enkelt batch.
 - Hver prøve i batchen tildeles en entydig position på en 12-positions rørstrimmel brugt til hybridisering, og som er registreret som del af kørselssæt-id'et på instrumentet (kørselssæt-id udført gennem webprogrammet). Bemærk, at position 1 og 2 er reserveret til referenceprøven, og position 3-12 er til tumor-RNA-prøver.
 - Illustrationen nedenfor viser sidevisning 1) og topvisning 2) af rørstrimlen. Rørstrimlerne er tilpasset asymmetrisk mellem reaktionsbrønd 1 og 2 (A) og 8 og 9 (B) for lettere at bevare prøverækkefølgen under behandling. Rørstrimlerne har også hakker mellem reaktionsbrønd 6 og 7 (C) for at forenkle overskæring af rørstrimlerne, hvis det er nødvendigt for at gøre plads til standardcentrifugeadaptere.

Figur 6: Illustration af tilpassede rørstrimler



- Beregn mængden af RNA og vand (når påkrævet), som skal føjes til hybridiseringsreaktionen for hver prøve i batchen.
 - Det anbefalede RNA-input er 250 ng for prøven. Det acceptable RNA-inputområde for hybridisering er 125 - 500 ng.
 - Beregn volumen (i mikroliter) af RNA-prøve, der skal føjes til hybridiseringsreaktionen, ved at dividere det ønskede prøveinput (f.eks. 250 ng) med den målte koncentration.
 - Hvis prøvens beregnede koncentration ligger mellem 12,5 ng/ μ L og 25 ng/ μ L, skal du tilføje den maksimale volumen på 10 μ L.

- d. I forbindelse med prøver, der kræver mindre end 10 µL, skal du beregne den vandvolumen, der kræves for at generere 10 µL samlet prøvevolumen.

Eksempel: For en prøve med en målt RNA-koncentration på 85 ng/µL, kræves 2,9 µL af prøven for at opnå en samlet masse på 250 ng, og der kræves 7,1 µL vand for at bringe volumen til 10 µL, før de resterende reagenser tilføjes. Som ligning: $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{L} = 2,9 \mu\text{L}$

Prøveregistrering og -behandling

Brugeren skal opbygge et entydigt kørselsæts-id for hver batch af prøver, så prøve-id'erne knyttes til rørstrimmelplaceringen (position 3-12), vha. nCounter-analysesystemets webprogram. Brugeren kan se brugervejledningen for at få anvisninger for brug af nCounter-analysesystemets webprogram.

1. Hvis RNA blev frosset før brug, skal du udføre følgende trin, før der fortsættes:
 - a. Optø RNA-prøverne helt, og opbevar dem på is.
 - b. Centrifuger det optøede prøverør i 1 minut ved maksimal hastighed ($>10.000 \times g$), og læg det tilbage på is.
 2. Vælg den passende Prosigna-testsætsstørrelse baseret på antallet af patientprøver, der testes (2, 3, 4 eller 10). Tag et rør fra hvert af følgende CodeSet-sæts reagenser ud af den -80 °C kolde fryser til optøning. Opbevar reagenserne på is, hvis du ikke fortsætter med de efterfølgende trin øjeblikkeligt.
 - a. Prosigna reporter-CodeSet (grønt klistermærke på hætte)
 - b. Prosigna opsamlings-ProbeSet (gråt klistermærke på hætte)
 - c. Prosigna-referenceprøve (intet klistermærke på hætte)
 3. Tag strekkodeklistermærket til CodeSet-partiet og en testkonfigurationskode ud af CodeSet-boksen.
 4. Brug en webbrowser til at logge på IVD nCounter-analysesystemets webprogram, og vælg Prosigna som analysetype for at starte konfigurationen af de digitale registreringsformularer.
 5. På hovedsiden skal du vælge "Create New Run Set" (Opret nyt kørselsæt).
 6. Det første påkrævede felt ved defineringen af en Prosigna-kørsel er kørselsæt-id'et. Indtast et entydigt id i feltet Run Set ID (Kørselsæt-id) for at identificere batchen af prøver.
 7. Scan eller indtast manuelt testkonfigurationskoden i webprogrammet. Når den er scannet eller indtastet, kan den kasseres.
 8. Scan eller indtast manuelt CodeSet-sætnummeret i webprogrammet.
 9. Indtast derefter det entydige prøve-id for den prøve, der vil være placeret i tredje position/brønd på rørstrimlen, i den tilsvarende prøve-id-felt.
 - a. Indtast patientens RNA-prøve-id vha. en strekkode-scanner eller manuelt ved at indtaste prøve-id'er vha. et tastatur.
 - b. Efter indtastning i hvert prøve-id skal du tabulere over for at udfylde de påkrævede rullefelter (samlet tumorstørrelse og nodestatus) for prøven, før du angiver den næste prøve.
 - i. Brug antallet af positive noder, som blev etableret under patientens patologiske evaluering, for at vælge den passende nodakategori til testen (nul, 1-3, ≥ 4).
 - ii. Brug den målte samlede tumorstørrelse eller -fase, som blev etableret under patientens patologiske evaluering, til at vælge den passende samlede tumorstørrelseskategori til testen ($\leq 2 \text{ cm}$ eller $>2 \text{ cm}$).
 - c. Eventuelle kommentarer kan indtastes i det valgfri felt Memo (Notat) for hver prøve.
- Bemærk:** Hvis nogen rørstrimmelbrønde/-positioner ikke kræves, skal de resterende felter lades være tomme. Hvis der kræves yderligere felter til flere prøver, skal du bruge en anden testkonfiguration, der har plads til flere prøver.
10. Efter gennemførelse af prøveindtastningen, skal du angive, hvilke brugere skal modtage følgende:
 - a. Statusopdateringer for kørslerne på klargøringsstationen og på den digitale analyseenhed.
 - b. Meddelelse om, at den endelige rapport er tilgængelig.
 11. Gem det fuldførte kørselsæt.
 - a. Arbejdsarket for kørselsættet kan udskrives og bruges til prøvesporing og til verificering.

Procedure for hybridiseringsreaktion

Bemærk: I de følgende trin antages, at der bruges ti (10) patientprøver og to (2) referenceprøver.

Bemærk: Spind ikke reporter-CodeSet hurtigere end $3.000 \times g$ i mere end 10 sekunder, og brug ikke "impuls"-funktionen til at spinde. Hvis det gøres, vil det medføre, at centrifugen når maksimumhastighed, hvilket kan spinde CodeSet ud af opløsningen.

1. Programmer varmeblokken med 30 µL volumen, beregnet blok- og lågtemperatur og tidsindstillingen "forever" (evig) (eller tilsvarende indstilling for midlertidig standsning af tid). Indstil varmeblokkens temperatur til 65 °C og til 70 °C for det opvarmede låg.

Bemærk: I de følgende trin er det afgørende at bevare den rækkefølge, hvori prøverne blev føjet til rørstrimlen, så der sikres, at de svarer til rækkefølgen i kørselsæt-id'et.

2. Mærk den leverede tilpassede 12-brønds rørstrimmel for at skelne position 1-6 fra position 7-12 (se illustrationen af en rørstrimmel).
3. Skær om nødvendigt rørstrimlen midt over, så den passer i minicentrifugen med en rørstrimmeladapter.
4. Pipetter 10 µL af referenceprøven til position 1 og 2 på den tilpassede rørstrimmel.
5. Pipetter den beregnede mængde vand, der kræves til hver prøve, til de respektive positioner på den tilpassede rørstrimmel.
6. Pipetter den beregnede mængde RNA, der kræves til hver prøve, til den passende position på den tilpassede rørstrimmel vha. en frisk pipettespids for hver prøve.
7. Når patientprøven er føjet til rørstrimlen, anbefales det at placere prøverøret i et prøverørstativ og bevare den rækkefølge, som prøven blev føjet til rørstrimlen. Dette gøres for at verificere, at prøver blev tilføjet i den tilsigtede rækkefølge, når alle prøver er føjet til rørstrimlen.
8. Når alle prøver er føjet til rørstrimlen, skal du verificere, at prøverækkefølgen blev bevaret i rørstrimlen (arbejdsarket for kørselsæt kan muligvis bruges til at verificere prøveordren).
 - a. Hvis det er nødvendigt, skal du redigere kørselsæt-id'et vha. webprogrammet, så prøverækkefølgen afspejles i det endelige layout (se brugervejledningen til nCounter-analysesystemet for at få anvisninger for redigering af et eksisterende kørselsæt-id).

9. Når prøveordren er blevet verificeret, skal du lægge de individuelle RNA-prøverør på is igen.

10. Opretten hovedblanding, der indeholder 130 µL hybridiseringsbufferen og 65 µL reporter-CodeSet.

Bemærk: Hvis reporter-CodeSet blev gemt på is, skal det have rumtemperatur i 1 minut, før der tilsættes hybridiseringsbuffer.

11. Bland vha. pipettering, og spind kortvarigt hovedblandingen ned.

Bemærk: Føj ikke opsamlings-ProbeSet til hovedblandingen, OG opbevar ikke færdige hovedblandinger på is.

12. Pipetter 15 µL af hovedblandingen til hver af de 12 brønde. Brug en frisk pipettespids til hver brønd.

Bemærk: Efter gennemførelse af det **next (næste)** trin skal rørstrimlen placeres i varmeblokken ved 65 °C inden for 15 minutter.

13. Føj 5 µL opsamlings-ProbeSet til hver brønd vha. en ny pipettespids til hver brønd.

14. Sæt hættér på rørstrimmelbrøndene, og bland reagenserne ved at vende rørstrimlen flere gange og banke på den med en finger for at sikre komplet blanding.

15. Spind kortvarigt prøverne i rørstrimlen ned i en picofuge eller minicentrifuge (ved $< 3000 \times g$).

Bemærk: Brug en picofuge, der kan rumme en 12-brønds rørstrimmel, eller om nødvendigt en minicentrifuge, der kan rumme skårne rørstrimler.

16. Placer rørstrimlerne i en 65 °C varm varmeblok med et opvarmet låg. Inkubér hybridiseringsanalyser ved 65 °C i 15-21 timer. Hybridiseringer skal efterlades ved 65 °C, indtil de er klar til behandling på klargøringsstationen.

Bemærk: Kassér eventuelt ubrugt CodeSet.

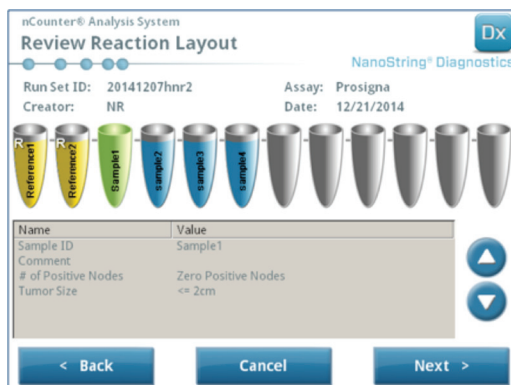
Behandling af prøver på nCounter-klargøringsstationen

1. Find den klargøringsstation, der er knyttet til den digitale analyseenhed.
2. Tag nCounter-Kassetten ud fra opbevaringen ved -20 °C, og lad den tilpasse sig stuetemperaturen i 10-15 minutter i folieposen.

Bemærk: Sørg for, at komponenterne fra samme sætparti bruges sammen.
3. Når Kassetten har nået stuetemperatur, skal du tage den ud af folieposen, før du sætter Kassetten på klargøringsstationens dæk.

4. Fjern nCounter klargøringsplad(er) fra opbevaring ved 4 °C og lad dem blive balanceret efter rumtemperatur i 10–15 minutter.
Bemærk: Der kræves kun én Klargøringsplade til kørsler, der udføres vha. et Prosigna-sæt med 2, 3 eller 4 test.
5. Centrifuger Klargøringspladerne ved $2000 \times g$ i 2 minutter for at opsamle væsker i bunden af brøndene, før klargøringspladerne sættes på klargøringsstationens dæk.
6. Mens kassetterne og klargøringsplade(r) får rumtemperatur, skal klargøringsstationen forberedes med nforbrugsstoffer fra klargøringspakkerne.
7. Tryk på knappen "Diagnostics" (Diagnose) på beröringsskærmen på nCounter-klargøringsstationen for din analyse.
8. Tryk på knappen "Process Samples" (Behandl prøver) under skærmen Main Menu (Hovedmenu) på beröringsskærmen.
9. Gennemse listen over tilgængelige kørselssæt-id'er (RSID), som vist på skærmen, for at bekræfte RSID for de prøver, der aktuelt behandles.
10. Vælg RSID ved at berøre skærmen, og vælg "Next" (Næste) på beröringsskærmen.
11. På beröringsskærmen skal du bekræfte, at det rigtige RSID blev valgt ved at klikke på hvert rør på skærmen og krydsreferere prøveoplysningerne.
 - a. Arbejdsarket for kørselssættet kan bruges her til prøvesporing og til verificering.
 - b. Hvis der blev valgt forkert RSID, skal du berøre knappen "Back" (Tilbage) og vælge det rigtige RSID.
 - c. Hvis RSID var rigtigt, men der forekommer fejl i prøveindtastningen, skal du berøre knappen "Back" (Tilbage) og gå til en computerarbejdsstation og redigere RSID via webprogrammet.

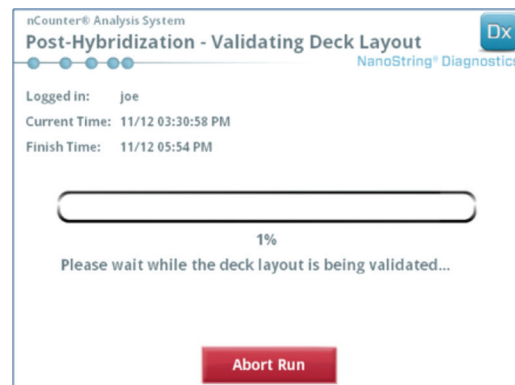
Figur 7: Behandle en kørselsskærm på klargøringsstationen



12. På de næste skærme bedes du om at scanne de anmodede reagensstregkode-id'er i de åbne felter eller bekræfte placeringen af de påkrævede forbrugsvarer på dækket. Efter udførelse af hver opgave skal du vælge "Next" (Næste) på beröringsskærmen for at gå til næste prompt.
- Bemærk:** Der kræves kun én klargøringsplade og én tom rørstrimmelsvarmer til kørsler, der udføres vha. et Prosigna-sæt med 2, 3 eller 4 test. Ved sætkørsler med 2, 3 eller 4 test skal klargøringspladen og en tom rørstrimmelsvarmer isættes i deres respektive frontpositioner (nærmest brugeren) på klargøringsstationens dæk.
13. Fjern prøver fra varmeblokken.
Bemærk: Start kørslen på klargøringsstationen inden for 15 minutter efter aftagning af prøverne fra varmeblokken.
14. Placer rørstrimlerne i en picofuge eller minicentrifuge, og spind kortvarigt ned (ved $< 3000 \times g$).
15. Fjern forsigtigt rørhætter fra rørstrimlerne.
16. Hakkene på rørstrimlen og styrene på klargøringsstationen skal bevare den korrekte rækkefølge og retning for prøverne.
17. Placer rørstrimlerne med brøndene i rækkefølgen 1-12 fra venstre-mod-højre på nCounter-klargøringsstationens dæk. Hvis du udfører en kørsel med et sæt med et sæt med 2, 3 eller 4 tests, skal kun den første halvdel af rørstrimlen (brønd 1-6) placeres i venstre side af prøverørsholderen på dækket, når dette er relevant. Bemærk, at det er vigtigt kun at bruge brønd 1-6. Den anden halvdel af rørstrimlen (brønd 7-12) vil ikke passe på venstre halvdel af holderen på grund af rørets design med hakker.
18. Bekræft, at rørstrimlen sidder godt fast på klargøringsstationen, og luk metallåget.

19. Hvis låget ikke lukkes korrekt, bedes du om at lukke det under valideringen af dækkets layout.
20. Vælg "Next" (Næste) på beröringsskærmen.
21. Luk instrumentdøren, når du bedes om det, og vælg "Next" (Næste) for at starte valideringen af dæklayoutet.
22. Hvis der opstår en fejl, skal du følge anvisningerne for den specifikke fejl for at fortsætte valideringen af dæklayoutet.

Figur 8: Validering af dæklayout på klargøringsstationen efter hybridisering



23. Når dæklayoutet er blevet valideret, skal du vælge "Start Processing" (Start behandling) på beröringsskærmen.
Bemærk: Hvis der opstår problemer med at starte klargøringsstationen, skal du returnere dine hybridiserede prøver til varmeblokken, men overskrid ikke det maksimale tidsrum på 21 timer.
24. Følg prompterne på klargøringsstationen, når kørslen er fuldført.
25. Når klargøringsstationen har afsluttet kørslen, skal du forsigtigt fjerne Kassetten fra klargøringsstationen og forsegle brøndene på kassetten med det leverede klæbende dæklag til kassettebrøndene.
Bemærk: Lad ikke kassetterne forblive uforsegledede på klargøringsstationen natten over.
26. Hvis du ikke scanner prøverne inden for samme dag, skal du opbevare Kassetten ved 4 °C i en uigenomsigtig boks i op til 1 uge.

Scanning af Kasette på nCounter Digital analyseenhed

1. Find den digitale analyseenhed, der er knyttet til den klargøringsstation, hvorpå prøverne blev behandlet. Sæt Kassetten på nCounter Digital analyseenhed til scanning.
 - a. Åbn døren på den digitale analyseenhed.
 - b. Placer den Kasette, der skal tilføjes, på en ledig plads.
 - c. Luk døren, og se beröringsskærmen.
2. Beröringsskærmen på den digitale analyseenhed har flere forskellige grafikker til lettere at identificere positionsstatussen:
 - a. Tom placering: Denne plads er tom og er klar til at blive fyldt med en ny Kasette.
 - b. Helt blå kasette: Gennemførte scanning.**TAG IKKE FØLGENDE KASSETTER UD:**
 - a. Hvid Kasette: Denne plads indeholder en Kasette, der er registreret, men ikke scannet.
 - b. Delvis blå Kasette: Denne plads indeholder en Kasette, der er ved at blive scannet.
3. Kassetter, der er blevet scannet, kan fjernes fra den digitale analyseenhed.
4. Hvis dette er den første Kasette, der sættes på den digitale analyseenhed, skal du berøre knappen "Diagnostics" (Diagnose) og derefter vælge "Main Menu" (Hovedmenu) for at logge på den digitale analyseenhed. Hvis den digitale analyseenhed allerede scanner Kassetter, skal du fortsætte til trin 9 nedenfor.
5. Placer omhyggeligt Kassetten på en ledig plads (se guiden til positionsstatus ovenfor) på den digitale analyseenhed. Pladsen og Kassetten er tilpasset for at sikre korrekt retning. Stregkoden vil vende opad.
6. Sænk dæklaget over pladsen, og tryk på Kassetten gennem åbningen i låget over pladsen for at sikre, at Kassetten sidder korrekt.
7. Berør knappen "Start Counting" (Start tælling), og vent, til scanneren begynder scanningen. Der høres en række små rytmiske klikkelyde, når den digitale analyseenhed begynder at scanne Kassetten.
8. Bekræft, at der vises en blå bjælke i Kassettepositionen på skærmen (inden for fem minutter efter start af scanningen), hvilket angiver, at scanning er startet.

- Hvis du vil tilføje en Kassette på en digital analyseenhed, der allerede scanner Kassetter, skal du berøre "Pause" på skærmen "Counting Cartridges" (Tæller Kassetter) og vente, til den digitale analyseenhed standser den aktuelle scanning midlertidigt.
- Åbn døren på den digitale analyseenhed.
- Placer den Kassette, der skal tilføjes, på en ledig plads (se guiden til positionsstatus ovenfor).
- Luk døren, og berør "Resume" (Genoptag).
- Når scanningen er færdig, sender softwaren rapporten til den tidligere angivne e-mailadresse for brugeren.
- Efter modtagelse af besked via e-mail skal du fjerne den fuldførte Kassette og kassere den iht. institutionens retningslinjer.
- Brug linket i e-mailen til at åbne webprogrammet og hente alle de testrapporter, der er knyttet til det RSID, der behandles i øjeblikket.
- Efter fejl: Følg de anbefalinger, der er specificeret i testrapporten for den individuelle prøve eller systemfejl.

Bemærk: Individuelle prøvefejl betragtes ikke som systemfejl.

12 FEJLSØGNING OG TESTFEJL

Tabel 7: Fejlkode for testgentagelse

Fejlkode	Fejlbeskrivelse	Anbefalet handling
5	Scanningsfejl	Kør prøven igen med 250 ng RNA
7	Højt signal	Angiv prøvespecifikationer igen, og kør testen igen med 125 ng RNA.
6	Lavt signal	Angiv prøvespecifikationer igen, og kør testen igen med 500 ng RNA.
30	Lavt signal	Angiv prøvespecifikationer igen, og kør testen igen med 500 ng RNA.
31	Lavt RNA-signal	Angiv prøvespecifikationer igen, og kør testen igen med 500 ng RNA.

Årsager til at gentage analysen:

- Analyserapporten identificerer fejlbehæftede prøver, og der rapporteres ingen analyseresultater. Analyseresultaterne rapporteres i tilfælde af passede prøver.
- I analyserapporten identificeres fejltypen og den anbefalede handling i tilfælde af en analysefejl. RNA-koncentrationen af fejlbehæftede prøver kan måles igen, og prøverne kan køres igen (som del af en ny batch/RSID) afhængigt af fejltypen og mængden af RNA-masse, der er tilbage, for at opnå et analyseresultat.

13 RESULTATER AF ANALYSEN

Prosigna-analysen omfatter en række kvalitetskontrollmetrikker, der automatisk anvendes på hver prøve under analyse. Disse metrikker vurderer analysens ydelse for at bestemme, om resultaterne falder inden for de forventede værdier. Efter vellykket analyse af disse kvalitetskontrollmetrikker giver Prosigna-analysen følgende resultater:

Tabel 8: Resultater af og output fra Prosigna-analysen

Resultat	Outputværdier
Den intrinsiske undertype af brystkræftprøven	Luminal A Luminal B HER2-beriget Basal-lignende
Individuel vurdering af sandsynligheden for distant recidiv inden for 10 år	0-100 %
Recidivrisikoresultat (ROR)	Heltalsværdi på en skala fra 0-100
Risikokategori	Lav, mellem, høj

13.1 Intrinsiske undertyper

Den intrinsiske undertype af brystkræfttumor er blevet påvist at være relateret til prognosen i brystkræft i tidlig fase. Gennemsnitligt har patienter med en Luminal A-tumor betydeligt bedre udsigter end patienter med Luminal B, HER2-beriget eller Basal-lignende tumorer²⁵.

Den intrinsiske undertype identificeres ved at sammenligne genekspressionsprofilen af 50 gener i en ukendt prøve med de forventede ekspressionsprofiler for de fire intrinsiske undertyper. Undertypen med den

mest lignende profil tildeles til den ukendte prøve.

De mest almindelige undertyper af brystkræft er de luminal undertyper; Luminal A (LumA) og Luminal B (LumB). Tidligere undersøgelser tyder på, at Luminal A udgør ca. 30-40 % og Luminal B ca. 20 % af brystkræfttilfælde⁵. Dog har mere end 90 % af hormonreceptorpositive patienter luminal tumorer. Disse undertypers genekspressionsmønster ligner den luminal epitelkomponent af brystvæv⁵. Disse tumorer er kendetegnet ved høj ekspression af østrogenreceptor (ER), progesteronreceptor (PR) og gener forbundet med ER-aktivering, f.eks. LIV1, GATA3 og cyclin D1, samt ekspression af de luminal cytotokeratiner 8 og 18. Luminal A-brystkræft udviser lavere ekspression af gener, der er associeret med celleyklusaktivering, til sammenligning med Luminal B-brystkræft, hvilket giver en bedre prognose.

Tidligere undersøgelser tyder på, at undertypen HER2-beriget (HER2-E) udgør ca. 20 % af brystkræfttilfælde⁵. Dog er HER2-berigede tumorer generelt ER-negative, så kun 5 % af den testede ER-positive patientpopulation blev fundet at have HER2-beriget brystkræft. Uanset ER-status er HER2-berigede tumorer HER2-positive i størstedelen af tilfælde med høj ekspression af ERBB2-klungen, herunder ERBB2 og GRB7. Gener, der er knyttet til celleyklusaktivering, har også høj ekspression.

Publicerede data tyder på, at undertypen Basal-lignende udgør ca. 20 % af brystkræfttilfælde⁵. Dog er Basal-lignende tumorer generelt ER-negative, så kun 1 % af hormonreceptorpositive patienter har Basal-lignende brystkræft. Undertypen Basal-lignende er næsten altid klinisk HER2-negativ og udtrykker en række "basale" biomarkører, herunder basale epitelcytotokeratiner (CK) og epidermal vækstfaktorreceptor (EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor). Gener, der er knyttet til celleyklusaktivering, har høj ekspression.

13.2 ROR-resultat

ROR-resultatet er en heltalsværdi på en skala fra 0-100, som er relateret til en individuel patients sandsynlighed for distant recidiv inden for 10 år for den definerede population til tilsigtet brug. ROR-resultatet beregnes ved at sammenligne ekspressionsprofilen af 46 gener i en ukendt prøve med de forventede ekspressionsprofiler for de fire intrinsiske undertyper, som beskrevet ovenfor, for at beregne fire forskellige korrelationsværdier. Disse korrelationsværdier kombineres derefter med et spredningsresultat og den samlede tumorstørrelse for at beregne ROR-resultatet.

13.3 Sandsynlighed for 10-års distant recidiv

ROR-resultaterne for 2 kohorter af postklimakterielle kvinder med hormonreceptorpositiv brystkræft i en tidlig fase blev sammenlignet med distant recidiv-fri overlevelse efter kirurgi og behandling med 5 års adjuvant endokrinbehandling efterfulgt af 5 års observation (se Klinisk ydelse i afsnit 16.4 for at få flere oplysninger). Disse to undersøgelser resulterede i en model, der relaterer ROR-resultatet til sandsynligheden for distant recidiv i denne testede patientpopulation, inklusive et konfidensinterval på 95 %.

13.4 Risikoklassificering

Risikoklassificering leveres også for at muliggøre tolkning af ROR-resultatet gennem brug af afskæring, der er relateret til klinisk resultat i testede patientpopulationer.

Tabel 9: Risikoklassificering efter ROR-område og nodalstatus

Nodalstatus	ROR-område	Risikoklassificering
Nodenegativ	0-40	Lav
	41-60	Mellem
	61-100	Høj
Nodepositiv (1-3 noder)	0-15	Lav
	16-40	Mellem
	41-100	Høj
Nodepositiv (≥ 4 noder)	0-100	Høj

13.5 Kvalitetskontrol

Hvert parti af Prosigna-analysekomponenterne testes ud fra forudbestemte specifikationer. Alle elementer på sætniveau spores, og de kritiske komponenter i hvert sæt testes sammen og frigives som et Prosigna-sætparti.

Prosigna-analysesættet omfatter en række interne kontroller, der bruges til at vurdere kvaliteten af hvert kørselssæt som et hele og hver prøve individuelt. Disse kontroller er angivet nedenfor.

Batchkontrolsæt: *In vitro*-transkriberet RNA-referenceprøve

Der er inkluderet en syntetisk RNA-referenceprøve som en kontrol i Prosigna-analysesættet. Referenceprøven består af *in vitro*-transkriberede RNA-mål fra 50-gens algoritmen og 8 husholdningsgener. Referenceprøven gennemgår

dubleret behandling i hver Prosigna-analysekørsel sammen med et sæt på op til 10 RNA-prøver med ukendt brystkræft i en 12-reaktions rørstrimmel. Signalet fra referenceprøven analyseres mod foruddefinerede tærskler for at kvalificere kørslen.

Signalet fra hvert af de 50 algoritmegener i RNA-prøven for brystkræft normaliseres til de tilsvarende gener i referenceprøven.

Positivkontrolsæt *in vitro*-transkriberede RNA-mål og tilsvarende opsamlings- og reporterprober

Syntetiske RNA-mål bruges som positive kontroller (PC'er) til Prosigna-analysen. PC-målsekvenserne er afledt fra ERCC-biblioteket (External RNA Control Consortium) for DNA-sekvenser⁶. RNA-målene er *in vitro*-transkriberet fra DNA-plasmider. Der er inkluderet seks RNA-mål i analysesættet i en firedobbelt titrationsserie (128 – 0,125 fM endelig koncentration i hybridiseringsreaktionen) sammen med de resterende opsamlings- og reporterprober. De positive kontroller (PC'er) føjes til hver brysttumors RNA-prøve og Referenceprøve, som er testet med Prosigna-analysen. En prøve vil blive diskvalificeret fra yderligere analyse, hvis signalintensiteterne fra PC'erne ikke opfylder foruddefinerede tærskler.

Negativt kontrolsæt: exogene prober uden mål

Negativ kontrol for målsekvenser er afledt fra ERCC DNA-sekvensbiblioteker⁶. Proberne, der er designet til at detektere disse målsekvenser, er inkluderet som del af analysesættet uden den tilhørende målsekvens. De negative kontroller (NC'er) føjes til hver brysttumor RNA-prøve og referenceprøve testet med Prosigna-analysen som en kontrolforanstaltning. Prøven vil blive diskvalificeret fra yderligere analyse, hvis signalintensiteterne fra NC'erne ikke opfylder foruddefinerede tærskler.

RNA-integritetskontrolsæt: Husholdningsgener

Som del af Prosigna-sættet er inkluderet opsamlings- og reporter-prober, som er designet til at detektere 8 husholdningsgener og 50 algoritmegener. Ekspressionsniveauerne for de 8 husholdningsgener analyseres for at bestemme kvaliteten af den RNA, der udtækkes fra FFPE-vævsprøven og indtastes i Prosigna-analysen. Prøven vil blive diskvalificeret fra yderligere analyse, hvis ekspressionsniveauerne for husholdningsgenerne falder til under de foruddefinerede tærskler.

Husholdningsgenerne bruges også til at normalisere ved alle forskelle i den intakte RNA-mængde i en prøve før normalisering af Referenceprøven.

14 BEGRÆNSNINGER FOR PROCEDURERNE

1. Prosigna-analysen er blevet optimeret til at identificere den intrinsiske undertype af en brystkræfttumor og patientens 10 års risiko for distant recidiv som et ROR-resultat og risikokategori vha. rensed RNA, der er udtrukket fra formalinfikseret, paraffinindlejret humant brystvæv. Andre typer prøver eller fikseringsmidler er ikke blevet testet og bør ikke bruges.
2. Ydelsen af Prosigna-analysen blev valideret udelukkende vha. de procedurer, der er angivet på denne indlægsseddel. Ændringer af disse procedurer kan ændre testens ydelse.
3. Ydelseskarakteristika for Prosigna-analysen er blevet etableret for postklimakterielle kvinder med hormonreceptorpositiv brystkræft i en tidlig fase, som har modtaget 5 års adjuvant endokrinbehandling. Ydelse med andre behandlingsmetoder eller i andre patientpopulationer er ikke blevet fastlagt.
4. Hvis der føjes RNA af utilstrækkelig kvalitet til analysen, vil Prosigna-analysen muligvis ikke kunne give et gyldigt resultat og vil i stedet rapportere en analysefejl.
5. Fortolkningen af Prosigna-analyseresultaterne (intrinsisk undertype, ROR-resultat, risikokategori) skal vurderes i konteksten af andre klinisk-patologiske faktorer, patientens anamnese og evt. andre laborietestresultater.
6. Ydelsen af Prosigna-analysen er blevet etableret med RNA, der opfylder de specifikationer, der er defineret i forhold til den ovennævnte procedure. Ydelse med andre isoleret RNA, der ikke opfylder disse specifikationer, er ikke blevet fastlagt.
7. Kendte stoffer, der forstyrrer Prosigna-analysen, omfatter genomisk DNA og ikke-tumorstof (f.eks. normalt væv). Se de generelle analyseovervejelser, før du starter proceduren. Området med levedygtig invasivt karcinom skal være tydeligt identificeret af en patolog før kørsel af proceduren. Desuden skal hver RNA-prøve behandles med DNase. Før der fortsættes med patienttestprøver, skal hvert nye parti af DNase testes og kvalificeres iht. de angivne specifikationer, når der bruges et andet isolationssæt end Veracyte FFPE RNA-ekstraktionssættet.

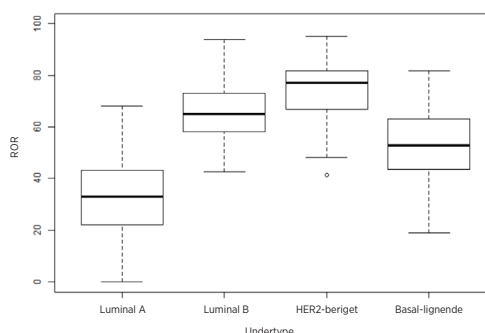
15 FORVENTEDE VÆRDIER

Prosigna-analysen rapporterer et ROR-resultat (0-100), en intrinsisk undertype (Luminal A, Luminal B, HER2-beriget eller Basal-lignende) og risikokategorisering (lille, mellem eller høj) for hver tumorprøve. Baseret på de to kliniske valideringsundersøgelser, der er beskrevet nedenfor, vises postklimakterielle kvinder med HR+ brystkræft i en tidlig fase behandlet med anastrozol eller tamoxifen i ATAC- og ABCSG-8-forsøgene, området og frekvensen af ROR-resultater (Figur 10), det kontinuerlige forhold mellem ROR og sandsynligheden for distant recidiv efter nodalstatus (Figur 11) og fordelingen af ROR-resultater efter intrinsisk undergruppe (Figur 9), som forventes. Baseret på disse kliniske valideringsundersøgelser er den distante recidiv-fri overlevelse over 10 efter risikokategorisering repræsenteret i Figur 12 (nodenegative patienter) og Figur 13 (nodepositive (1-3 noder) patienter).

15.1 ROR-område efter undertype

I Figur 9 vises et boksplot for ROR-resultat efter intrinsisk undertype.

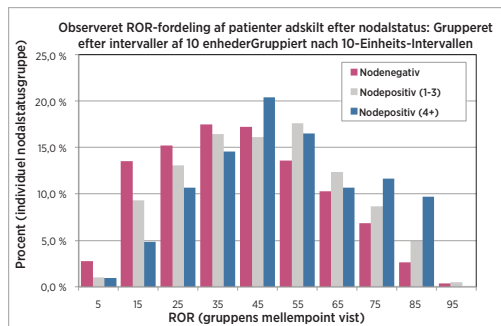
Figur 9: Boksplot for ROR-resultat efter intrinsisk undertype



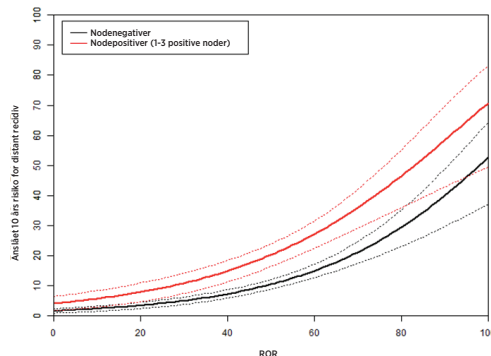
15.2 Frekvens af ROR-resultat efter nodalstatus

Histogrammet i Figur 10 blev genereret vha. en enkelt Cox-model, der inkluderede ROR-resultat og kategoriske variabler for at skelne mellem de tre grupper for nodal involvering.

Figur 10: Histogram for ROR-resultat efter nodalstatusgrupper



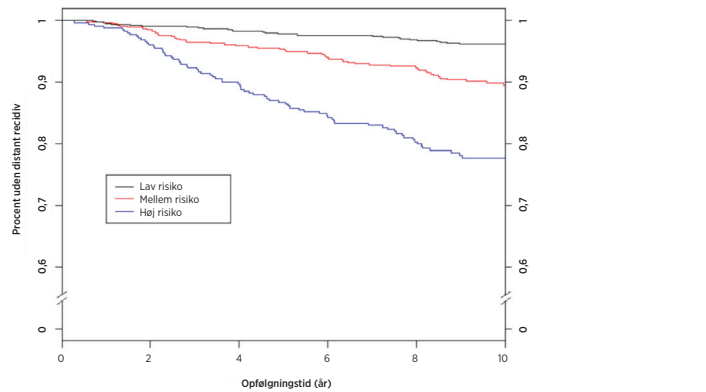
Figur 11: 10 års forudsagt risiko anslået i nodalstatusgruppen



15.3 Distant recidivfri overlevelse (DRFS) efter risikokategorisering

Følgende data stammer fra den kombinerede analyse af TransATAC- og ABCSG-8-forsøgene. Men henblik på allokering af patienter til risikogrupper blev ROR-resultater sammenlignet med foruddefinerede risikotærskler for nodenegative eller nodepositive patienter. I Figur 12 og 13 vises 10 års distant recidiv-fri overlevelse for hver risikokategori-gruppe efter nodalstatus.

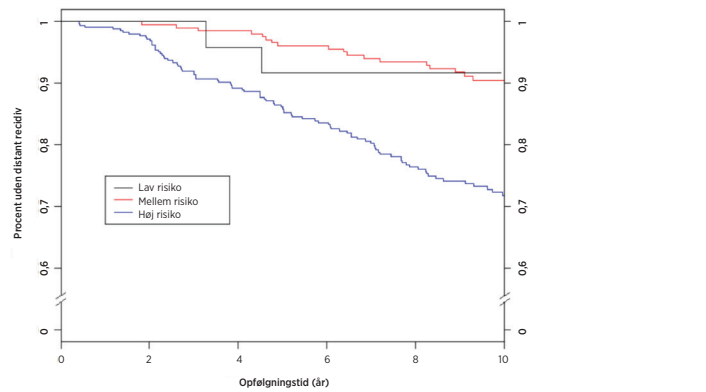
Figur 12: DRFS efter risikogruppe for nodenegative patienter



Oversigt over data i Figur 12: DRFS efter risikogruppe for nodenegative patienter

Risikogruppe	Antal patienter (%)	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Lav	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7 % - 97,3 %]
Mellem	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1 % - 91,7 %]
Høj	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8 % - 81,9 %]
Total	1.786 (100 %)	157	

Figur 13: DRFS efter risikogruppe for nodepositive (1-3 noder) patienter



Oversigt over data i Figur 13: DRFS efter risikogruppe for nodepositive (1-3 noder) patienter

Risikogruppe	Antal patienter (%)	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Lav	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6 % - 97,8 %]
Mellem	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2 % - 93,9 %]
Høj	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3 % - 76,6 %]
Total	590 (100 %)	107	

Tabel 10: 10-års DRFS-frekvenser for patienter med 4 eller flere positive noder

Risikogruppe	Antal patienter	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Høj	103	39	57,4 % [46,3 % - 67,0 %]

16 YDELSESKARAKTERISTIKA

16.1 Analytisk præcision og reproducerbarhed

For at anslå den overordnede præcision og reproducerbarhed af Prosigna blev der gennemført to undersøgelser, og resultaterne blev kombineret. Den første undersøgelse, der blev udført, var en præcisionsundersøgelse på nCounter-analysesystemet, som startede med udtrukket RNA fra brysttumor, og den anden undersøgelse var en reproducerbarhedsundersøgelse, som startede fra FFPE-brystkræftvæv, der inkluderede præanalytiske faktorer.

RNA-præcision

16.1.1 Undersøgelsesdesign

Der blev udført en tresteds blændet og randomiseret sammenlignende undersøgelse med Prosigna-analysen på nCounter-analysesystemet for at vurdere analytisk præcision. Der blev genereret fem samlede RNA-prøver for brysttumor ud fra arkiverede FFPE-prøver til test på hvert sted. Prøvepanelet repræsenterede prototypiske genekspressionsprofiler, der blev fundet under rutinemæssig test, og hver risikoklassificeringsgruppe.

Hvert sted gennemførte 18 gyldige kørsler (9 kørsler pr. operatør og hver kørsel bestående af 10 test) efterfulgt af en familiariseringskørsel pr. operatør (Tabel 11). Hver prøve gennemgik dubleret test under hver kørsel ved det nominelle RNA-inputniveau på 250 ng for analysen. Hver operatør gennemførte én kørsel på en given dag iht. den generelt accepterede standard for metoder til lang kørsel⁷. Den samlede undersøgelsesperiode, inklusive familiarisering, dækkede mere end 4 uger for hvert sted.

Tabel 11: Oversigt over RNA-præcisionsundersøgelse

Undersøgelsesvariabel	Tal
antal RNA-prøver for brysttumor	5
antal prøvegentagelser pr. kørsel (samme kassette)	2
antal kørsler/sted	18
antal kørsler/dag	1
antal operatører/sted	2
antal reagenspartier/sted	3
antal steder	3
Samlet antal prøver testet pr. sted (ekskl. familiarisering)=	180
Samlet antal prøver =	540

16.1.2 Analyse af varianskomponenter

Tabel 12 viser output fra varianskomponentanalysen for hvert panelmedlem. Under den anslåede varians findes procentværdien for samlet varians (i parentes).

Tabel 12: Varianskomponenter efter panelmedlem (samlet RNA-prøve)

Panelmedlem efter risiko, undertype	Middel ROR	Varianskomponent					Samlet varians	Samlet standardafvigelse
		Parti	Sted	Operatør	Kørsel	Inden for kørsel		
Lav luminal A	31,4	0,010 (2 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,134 (30 %)	0,296 (67 %)	0,44 (100 %)	0,66
Mellem luminal B	55	0,105 (18 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (8 %)	0,426 (74 %)	0,576 (100 %)	0,76
Mellem basal-lignende	55,4	0,059 (20 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (15 %)	0,194 (65 %)	0,299 (100 %)	0,55
Høj luminal B	64,8	0,119 (21 %)	0,014 (2 %)	0,000 (0 %)	0,064 (11 %)	0,380 (66 %)	0,576 (100 %)	0,76
Høj HER2-beriget	76,2	0,165 (37 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,277 (63 %)	0,442 (100 %)	0,66

For alle fem panelmedlemmer var den samlede standardafvigelse mindre end 1 ROR-enhed på en skala fra 0-100. For alle panelmedlemmer kom hovedparten af variansen fra varians inden i kørslen (repetérbarhed). Der var næsten ingen sted-til-sted-variens eller operatør-til-operatør-variens. En sandsynlighedsforholdstest for signifikans efter panelmedlem demonstrerede, at forskellen mellem steder var statistisk insignifikant (p >0,05). For hvert parti er middel-ROR-resultaterne mindre end 1 ROR-enhed fra hinanden for hvert panelmedlem, hvilket bidrager gennemsnitligt ca. 20 % i den samlede varians.

16.1.3 Overensstemmelse for undertypekald og risikoklassificering

For alle panelmedlemmer var der 100 % overensstemmelse mellem undertyperesultat og den intrinsiske undertype af panelmedlemmet. For alle prøver var der 100 % overensstemmelse mellem målt og forventet risikogruppe.

Reproducerbarhed for væv

16.1.4 Undersøgellesdesign

En tresteds blændet og randomiseret sammenlignende undersøgelse med brug af replikerede prøver af brystkræftvæv taget fra samme FFPE-blok blev testet på nCounter-analysesystemet vha. Prosigna-analysen. Et sæt på 43 for nyligt arkiverede FFPE-brysttumoprøver fra hormonerceptorepositive brystkræftpatienter med bekræftet invasivt duktalt og/eller lobulært karcinom blev testet som del af undersøgelsen. Alle vævsprøver blev sendt til det relevante teststed til behandling. De 43 prøver blev vurderet separat og uafhængigt af tre forskellige patologer. For hver patologvurderet vævsprøve blev der udført en testkørsel bestående af makrodissektion af væv, RNA-udtrækning og -test med Prosigna-analyse af en enkelt operatør på hvert sted vha. den definerede analyseprocedure. Den isolerede RNA fra hver af vævsprøverne blev testet to gange i separate analysekørsler. Der blev brugt tre partier af RNA-isolationssæt (ét pr. sted) og et enkelt parti af analysesætreagenser ved gennemførelsen af denne undersøgelse. Der blev brugt et enkelt objektglas til RNA-udtrækning, når tumoroverfladeområdet målte $\geq 100 \text{ mm}^2$, og 3 objektglas, når tumoroverfladeområdet målte $< 100 \text{ mm}^2$, med et påkrævet minimalt tumoroverfladeområde på 4 mm^2 .

16.1.5 Opsummering af test

Kaldefrekvensen for de treogfyrre (43) vævsprøver, der blev evalueret på hvert af de tre steder, er vist i Tabel 13.

Tabel 13: Kaldefrekvens på hvert sted

Sted	Procent, der gav resultat	Bestået/total
1	95 %	41/43
2	93 %	40/43
3	100 %	43/43

Fyrre prøver gav resultater på alle steder (RNA-isolation af én prøve på ét sted krævede gentagelse), 1 prøve gav resultater på 2 steder, og 2 prøver gav resultater på et enkelt sted. Et hundrede procent (100 %) af prøver, der bestod vævsevalueringen, og RNA-isolations-specifikationerne gav bestået-resultater fra Prosigna-analysen. Det målte tumoroverfladeområde for 4/5 RNA-isolationsfejl var $\leq 15 \text{ mm}^2$, hvilket svarer til mindre end 50 mm^2 samlet væv efter område angivet i testen.

De 43 prøver omfattede både nodenegative og nodepositive patienter. De beregnede testresultater fra de 43 prøver repræsenterer et bredt område (94 enheder) af ROR-resultater, alle 4 intrinsiske undertyper og alle risikokategorier, når der anvendes nodenegative eller nodepositive afskæringer på alle prøver. De prøver med resultater på et enkelt sted, blev udelukket fra alle efterfølgende statistiske analyser, da der ikke var tilstrækkelige data til sammenligning på tværs af steder.

16.1.6 Analyse af varianskomponenter

Der var igen statistisk signifikante ($\alpha = 0,05$) forskelle på tværs af risikokategorier ved brug af en ikke-parametrisk Kruskal-Wallis-test, så varianskomponentmodellen blev tilpasset på tværs af alle risikokategorier samtidigt.

Tabel 14 viser resultaterne af varianskomponentAnalysen med brug af alle 41 vævsprøver.

Tabel 14: Varianskomponenter (undersøgelse af reproducerbarhed i væv)

Varianskomponenter				Samlet standardafvigelse
Sted	Inden for blok	Rest	Total	
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89

Stedkomponenten måler systematisk stedspecifik variation, komponenten "Inden i blok" måler tilfældig variation, der varierer som en funktion af vævsprøveevalueringen/-behandlingen eller inden for FFPE-blokvariation, og restvariationen måler den kombinerede variation fra kørsel til kørsel og variation inden for kørsel i Prosigna-analysen. Stedkomponenten er meget lille i forhold til den tilfældige variabilitet inden for blokken, hvilket angiver, at de gennemsnitlige forskelle mellem stederne var ubetydelig ($< 1\%$ samlet varians). Restvariationen var overensstemmende med den ækvivalente variabilitet, der blev målt i RNA-præcisionsundersøgelsen, der havde færre prøver, men flere replikerede målinger (0,51 varians til sammenligning med et gennemsnitligt enkelt sted inden for Prosigna-reagenspartivariansen på 0,39 for RNA-præcisionsundersøgelsen).

I Tabel 15 opsummeres den samlede variabilitet vha. summen af vævsbehandlingsvariabilitet (sted og inden for blokkomponenter fra Tabel 14 i denne undersøgelse) samt den samlede RNA-behandlingsvariabilitet fra RNA-præcisionsundersøgelsen (gennemsnit på tværs af de fem testede panelmedlemmer i Tabel 12). Præanalytiske faktorer, der er associeret med vævsbehandling, er den primære kilde til variation for testen (94 % af den samlede varians). Den samlede standardafvigelse, inklusive alle kilder til variation, svarer til 2,9, hvilket angiver, at Prosigna-analysen er et pålideligt mål for forskellen mellem to ROR-værdier på 6,75 med 95 % konfidens.

Tabel 15: Samlet variabilitet (vævs- og RNA-behandling)

Variabilitet i vævsbehandling	Variabilitet i RNA-behandling	Samlet variabilitet	Samlet standardafvigelse
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 Overensstemmelse for risikokategori og undertypeklassificeringer

Overensstemmelsen fra sted til sted efter patientundertype og risikoklassifikation (lav/mellem/høj risiko) er vist i Tabel 16, hvor de respektive risikoafskæringer for nodenegative og nodepositive klassificeringer blev anvendt på alle prøver. De 95 % konfidensintervaller af nøjagtig type er vist i parentes, og antallet af prøver med resultater på begge steder er vist i parentes. Den gennemsnitlige overensstemmelse er vist i sidste kolonne. For hver sammenligning blev overensstemmelsen beregnet i to trin. Først blev andelen af de fire mulige resultatpar (to på sted 1* to på sted 2) for hver vævsprøve, der passede, beregnet. I det andet trin blev gennemsnittet af disse andele beregnet på tværs af alle vævspar, der genererede resultater på begge steder i den givne sammenligning.

Tabel 16: Opsummering af overensstemmelse af undertype og risikokategori efter nodestatus

Sammenligningstype	Parvis overensstemmelse			Gennemsnitlig overensstemmelse
	Sted 1 ift. Sted 2 (n = 40)	Sted 1 ift. Sted 3 (n = 41)	Sted 2 ift. Sted 3 (n = 40)	
Undertype	96,3 % [86,4 % - 99,5 %]	98,8 % [91,0 % - 100 %]	95 % [83,1 % - 99,3 %]	97 %
Risikokategori Nodenegativ	87,5 % [73,2 % - 95,8 %]	92,7 % [80,1 % - 98,4 %]	90 % [76,4 % - 97,2 %]	90 %
Risikokategori Nodepositiv	88,8 % [75,9 % - 96,0 %]	92,7 % [80,1 % - 98,4 %]	91,3 % [79,2 % - 97,4 %]	91 %

For hver sammenligning (undertype og nodenegative og nodepositive risikokategorier) var den gennemsnitlige overensstemmelse mellem steder mindst 90 %. Der var ingen prøver, hvor risikokategorien ændrede sig fra lav risiko til høj risiko (eller omvendt) mellem eller inden for steder. Der var kun to prøver (ud af 41), der ikke gav identiske undertyper på tværs af alle 6 replikaer:

1. Én prøve havde dublerede Luminal A-resultater på ét sted og dublerede Luminal B-resultater på hvert af de andre to steder.
2. Én prøve havde dublerede Luminal A-resultater på ét sted, dublerede HER2-beriget resultat på et andet sted og én hver af Luminal A og HER2-beriget på det tredje sted.

16.2 Følsomhed/RNA-input

Beskrivelse af undersøgelse af RNA-input

Undersøgelsen testede 13 RNA-prøver fra brysttumor på tværs af RNA-inputniveauer inden for analysespecifikationen (500, 250 og 125 ng) og to yderligere RNA-inputniveauer uden for specifikationerne (625, 62,5 ng). Hver prøve blev testet med hvert sætparti (2 partier i alt) i en enkelt testkørsel, der inkluderede dublerede målinger på hvert niveau i specifikationen og en enkelt måling for hvert niveau uden for specifikationen. Dublerede tomme (dvs. ikke noget mål) målinger blev inkluderet i hver testkørsel. En enkelt prøve blev kun testet med et enkelt parti.

Resultater af undersøgelse af RNA-input

Alle målte tomme prøver (n = 46) var klart under tærsklen for signal og gav et ikke-bestået testresultat (0 % kaldefrekvens). Alle målinger af tumor-RNA i analysespecifikationen (n = 138) gav et bestået testresultat (100 % kaldefrekvens). Et hundrede procent (100 %) af prøver med input over specifikationen (625 ng) gav et bestået testresultat. Treogfirs procent (83 %) af prøverne (10/12), der blev testet ved input under specifikationen (62,5 ng), gav et testresultat i parti 1 med 100 % i parti 2.

Det gennemsnitlige ROR-resultat for de 13 prøver dækkede et bredt område (20-82). Risikogruppeklassifikationen (lav/mellem/høj) var 100 % overensstemmende på tværs af alle RNA-inputniveauer for de 13 testede prøver. I Tabel 17 opsummeres variationen i ROR-resultat som en funktion af RNA-input. Middelforskellen i ROR-resultat mellem RNA-inputniveauer, standardafvigelsen for forskellene og konfidensintervallet på 90 % blev brugt til at evaluere, om ROR-resultater, der blev genereret ud fra forskellige RNA-inputniveauer, var tilsvarende med dem, der blev genereret vha. målniveauet på 250 ng. For at opfylde acceptkriteriet skulle konfidensintervallet være fuldt indeholdt med (-3,3 ROR). På de to niveauer i det yderste grænser af analysespecifikationsområdet (125 og 500 ng RNA) svarede ROR-resultaterne til dem på målinputkoncentrationen på 250 ng for hver af de to testede sætpartier. For hvert niveau uden for analysespecifikationen svarede ROR-resultaterne til ét af partierne, men ikke det andet.

Tabel 17: Opsummering af forskel i ROR-resultat. Tælling svarer til antal prøver inkluderet i analysen.

Sætparti	Masse (ng)	Antal	Middel ROR-differens	Standardafvigelse for differens	Nedre konfidensgrænse	Øvre konfidensgrænse
20535	62,5-250	10	1,90	2,62	0,54	3,26
	125-250	12	0,75	1,23	0,16	1,34
	500-250	12	0,04	0,78	-0,33	0,41
	625-250	12	-0,13	0,86	-0,53	0,28
20536	62,5-250	11	-0,36	3,96	-2,33	1,60
	125-250	11	-0,50	3,07	-2,02	1,02
	500-250	11	-0,82	3,25	-2,43	0,79
	625-250	11	-1,09	4,24	-3,19	1,01

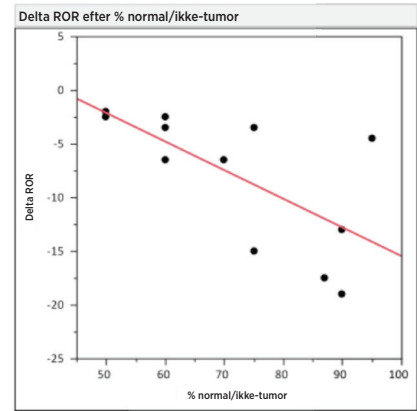
16.3 Interferenstest

Tilstødende normalt væv/ikke-tumorbvæv

Tilstødende normalt brystvæv/ikke-tumorbvæv findes normalt i FFPE-brysttumorblokke og kan identificeres efter patologicvaluering som et forskelligt område fra området med invasivt brystkarcinom. Prosigna-analyseproceduren ovenfor specificerer fjernelse af tilstødende normalvæv vha. makrodissektion. For at vurdere risikoen for kontamination med normalt væv af testresultaterne blev samlet 13 FFPE-brysttumorblokke, der indeholdt patologisk bekræftet infiltrerende ductalt karcinom, og ca. 50-95 % omgivende normalt væv/ikke-tumorbvæv blev testet med og uden makrodissektion af det omgivende væv testet, og forskellen i ROR-resultat (delta ROR) blev fastlagt.

I gennemsnit var ROR for den makrodissekerede tumorprøve næsten 8 ROR-enheder over det, der observeres, når normalt væv/ikke-tumorbvæv ikke fjernes. Figur 14 illustrerer, at i takt med at mængden af normalt væv øges (op til 95 % ikke fjernet vha. makrodissektion), er der en stigende risiko for, at det rapporterede ROR-resultat vil være en undervurderet eller negativt forudindtaget (op til -19 ROR-enheder) pointvurdering af en patients risiko for recidiv.

Figur 14: Påvirkning af normalt væv/ikke-tumorbvæv på Delta ROR



Forstyrrelser fra nekrotisk, hæmorrhagisk og DCIS-væv

For at vurdere risikoen for kontamination med nekrotisk, hæmorrhagisk/DCIS af testresultaterne blev samlet 11 FFPE-brysttumorblokke (3 DCIS, 5 nekrotiske, 3 hæmorrhagiske), der indeholdt patologisk bekræftet infiltrerende ductalt karcinom, og ca. 10-30 % af det forstyrrende væv blev testet med og uden makrodissektion af det forstyrrende væv testet, og forskellen i ROR-resultat (delta ROR) blev fastlagt. Ved de testede niveauer havde virkningen af blod/hæmorrhagisk, DCIS og nekrotisk væv, der blev inkluderet i proceduren, en ubetydelig virkning på det rapporterede ROR-resultat (< 6 ROR-enheder). Der var 100 % overensstemmelse i tildelingen af risikokategori mellem de elleve nekrotiske, hæmorrhagiske og DCIS prøver med og uden makrodissektion.

Humant genomisk DNA

Prosigna-analyseproceduren inkluderer fjernelse af humant genomisk DNA (gDNA) via fordøjelse med DNase. For at vurdere risikoen for kontamination med gDNA af testresultaterne blev 10 FFPE-brysttumorblokke, der indeholdt patologisk bekræftet infiltrerende ductalt karcinom, testet +/- fjernelse af humant genomisk DNA ved at udelade DNase-trinnet i proceduren. I de testede prøver var ROR-resultatet gennemsnitligt 4 til 5 enheder lavere i grupperne med Lav og Mellem risiko, når gDNA var fjernet vha. DNase I (se Tabel 18 nedenfor). Når de prøver, der ikke blev behandlet med DNase I, efterfølgende blev behandlet med DNase I (efterbehandling), svarede ROR-resultaterne til de ROR-værdier, der oprindeligt blev observeret med DNase-behandling iht. standardprotokol. Der er en risiko for, at det rapporterede ROR-resultat vil være en overvurderet eller positivt forudindtaget (op til 7 ROR-enheder) pointvurdering af en patients risiko for recidiv ved tilstedeværelse af gDNA: Desuden var det beregnede signal for prøver uden DNase I-behandling betydeligt (p < 0,05) lavere end dem, der blev behandlet med DNase I, på grund af forstyrrelser i den absorptionsaflysning, der blev brugt til at kvantificere mængden af RNA for test med Prosigna-analysen.

Tabel 18: Effekt af behandling med DNase på ROR i tumorprøver

ROR Kategori	FFPE-prøver testet	ROR-differens med DNase I - uden DNase I			ROR-differens med DNase I - med DNase I (efterbehandling)		
		Middel	Min.	Maks.	Middel	Min.	Maks.
Lav	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Mellem	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Høj	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

16.4 Klinisk ydelse

Der blev udført to kliniske valideringsundersøgelser for at validere Prosigna Prognostisk gensignaturanalyse for brystkræft. Det primære formål med begge undersøgelser var at validere publicerede observationer, der viste, at recidivrisikoresultatet (ROR) giver yderligere prognostiske oplysninger for distant recidiv-fri overlevelse ved 10 år ud over kliniske standardvariabler. Desuden var et sekundært mål med begge undersøgelser at validere tidligere observationer, der viste, at Luminal A- og Luminal B-patienter har statistisk betydelig forskellig recidiv-fri overlevelse ved 10 år. Fordi de indledende kriterier og resultaterne af disse to undersøgelser var lignende, blev de to databaser kombineret og analyseret med en præsumptivt defineret analyseplan, der havde samme mål som de individuelle undersøgelser.

Kombineret analyse: Generering af risikokurver vha. kombinerede resultater af Prosigna-analyse fra TransATAC og ABCSG-8.

Der findes en opsummering af behandling og kliniske karakteristika fra den kombinerede analyse nedenfor. Du finder oplysninger om individuelt undersøgelsesdesign og analyse i de følgende afsnit for Undersøgelse 1 og 2 respektivt.

Analyse

Tabel 19: Opsummering af behandling og kliniske karakteristika i kombineret undersøgelse af undersøgelseerne 1 og 2

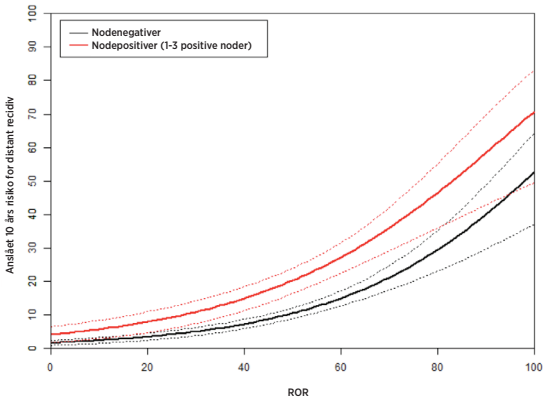
Karakteristika	Værdi	Nodenegativ (n = 1,786)		1-3 positive noder (n = 590)		≥ 4 positive noder (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1,047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Behandling	Noget	377	528	102	184	31	25
	Anastrozol	(51,0 %)	(50,4 %)	(49,0 %)	(48,2 %)	(57,4 %)	(51,0 %)
	Kun	362	519	106	198	23	24
Klasse	G1	169	210	39	54	3	7
	G2/GX	(22,9 %)	(20,1 %)	(18,8 %)	(14,1 %)	(5,6 %)	(14,3 %)
	G3	438	837	122	328	37	42
Tumorstørrelse	≤ 1 cm	(59,3 %)	(79,9 %)	(58,7 %)	(85,9 %)	(68,5 %)	(85,7 %)
	1-2 cm	132	0	47	0	14	0
	2-3 cm	(17,9 %)	(0 %)	(22,6 %)	(0 %)	(25,9 %)	(0 %)
	>3 cm	40	47	35	30	18	6
		(5,4 %)	(4,5 %)	(16,8 %)	(7,9 %)	(33,3 %)	(12,2 %)
HER2-status	Negativ	122	219	13	37	3	2
	Positiv	(16,5 %)	(20,9 %)	(6,2 %)	(9,7 %)	(5,6 %)	(4,1 %)
Recidiver	1-2 cm	420	568	83	193	15	18
	2-3 cm	(56,8 %)	(54,3 %)	(39,9 %)	(50,5 %)	(27,8 %)	(36,7 %)
	>3 cm	157	213	77	122	18	23
		(21,2 %)	(20,3 %)	(37,0 %)	(31,9 %)	(33,3 %)	(46,9 %)
HER2-status	Negativ	649	984	186	367	47	46
	Positiv	(87,8 %)	(94,0 %)	(89,4 %)	(96,1 %)	(87,0 %)	(93,9 %)
Recidiver	Distant	90	63	22	15	7	3
	Enhver	(12,2 %)	(6,0 %)	(10,6 %)	(3,9 %)	(13,0 %)	(6,1 %)
NanoString-intrinsisk undertype	Luminal A	79	91	50	64	31	10
	Luminal B	(10,7 %)	(8,7 %)	(24,0 %)	(16,8 %)	(57,4 %)	(20,4 %)
	Basal-lignende	117	121	59	73	34	10
	HER2-beriget	(15,8 %)	(11,6 %)	(28,4 %)	(19,1 %)	(63,0 %)	(20,4 %)
		529	725	127	248	31	31
HER2-beriget	Luminal A	(71,6 %)	(69,2 %)	(61,1 %)	(64,9 %)	(57,4 %)	(63,3 %)
	Luminal B	176	284	68	118	20	16
HER2-beriget	Basal-lignende	(23,8 %)	(27,1 %)	(32,7 %)	(30,9 %)	(37 %)	(32,7 %)
	HER2-beriget	7	6	2	2	0	0
HER2-beriget	HER2-beriget	(0,9 %)	(0,6 %)	(1,0 %)	(0,5 %)	(0 %)	(0 %)
	HER2-beriget	27	32	11	14	3	2
HER2-beriget	HER2-beriget	(3,7 %)	(3,1 %)	(5,3 %)	(3,7 %)	(5,6 %)	(4,1 %)
	HER2-beriget						

Begge undersøgelser havde en behandlingsdel bestående af 5 år med Tamoxifen. I TransATAC bestod undersøgelsesdelen af 5 år med Anastrozol, hvorimod undersøgelsesdelen i ABCSG-8-undersøgelsen bestod af 2 år med Tamoxifen efterfulgt af 3 år med Anastrozol. Når DR blev modelleret som en funktion af alle de kliniske variabler og behandlingsvariabler, bidrog behandlingen ikke væsentligt (p = 0,66) som en forudsigelse af distant recidiv. De andre hovedforskelle mellem disse forsøg var det faktum, at TransATAC-forsøget inkluderede patienter med tumorer i klasse 3, og at den generelle recidivfrekvens var højere i TransATAC-undersøgelsen end i ABCSG-8-undersøgelsen.

Resultater

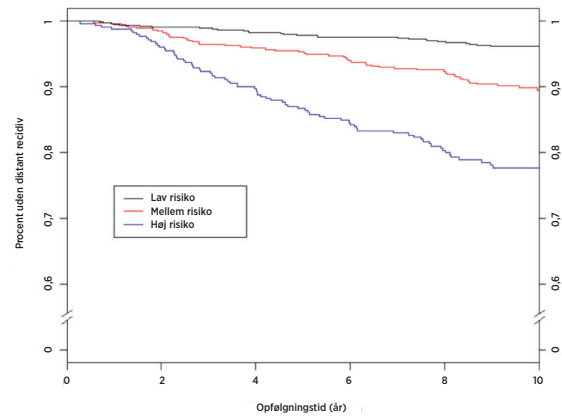
Figur 15 viser 10-års risikoen for distant recidiv som en funktion af ROR-resultat med 95 % konfidensbånd, der er baseret på separate Cox-proportionale faremodeller for hver af de node-negative og node-positive (1-3 positive noder) patientgrupper.

Figur 15: 10 års anslået risiko distant recidiv-risiko efter nodestatus med 95 % konfidensintervaller



Figur 16 viser Kaplan-Meier-plot og incidensplot efter risikogruppe for node-negative patienter, og Figur 17 viser samme plot for node-positive patienter med 1-3 positive noder. I begge figurer angives detaljer om prøvestørrelser, antal begivenheder og anslået procent uden distant recidiv ved 10 år efter risikogruppe. I den node-positive patientgruppe var der meget få patienter i de foruddefinerede lavrisikogrupper, hvilket forårsagede konfidensintervallet på Kaplan-Meier-kurven og dermed, at den anslåede 10-års DRFS var meget bred.

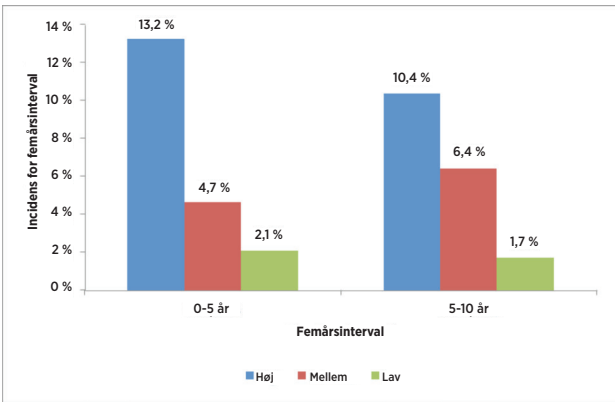
Figur 16A: DRFS efter risikogruppe for node-negative patienter



Figur 16B: Incidens efter risikogruppe for node-negative patienter i femårs intervaller

Risikogruppe	Antal patienter (%)	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Lav	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7 % - 97,3 %]
Mellem	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1 % - 91,7 %]
Høj	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8 % - 81,9 %]
Total	1,786 (100 %)	157	

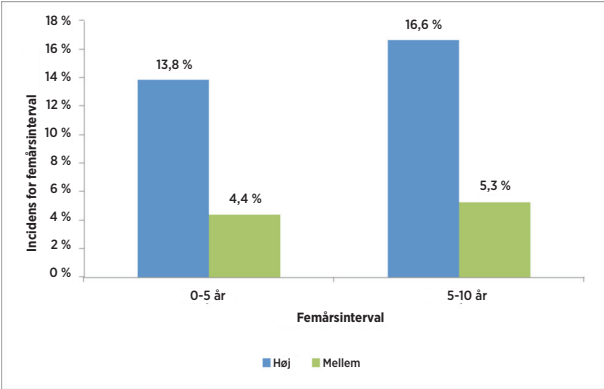
Figur 17A: DRFS efter risikogruppe for node-positive patienter med 1 til 3 positive noder



Oversigt over data i Figur 17A: DRFS efter risikogruppe for nodepositive patienter med 1 til 3 positive noder

Risikogruppe	Antal patienter (%)	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Lav	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6 % - 97,8 %]
Mellem	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2 % - 93,9 %]
Høj	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3 % - 76,6 %]
Total	590 (100 %)	107	

Figur 17B: Incidens efter risikogruppe for nodepositive (1-3 noder) patienter i femårs intervaller



Da der til Figur 17B kun var 24 patienter med 2 begivenheder i den nodepositive gruppe med lav risiko, er disse patienter blevet kombineret med patienterne med mellem risiko til analysen af sen recidiv.

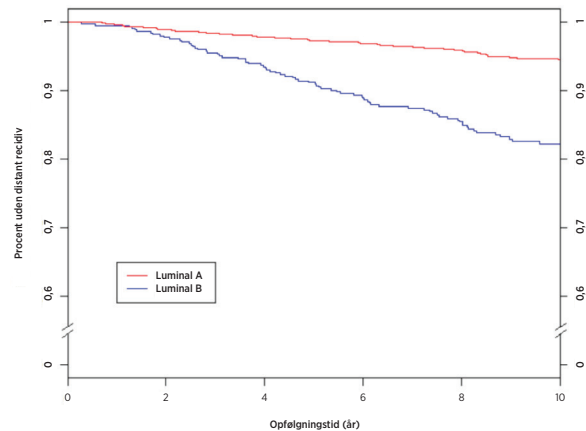
Alle 103 patienter i den kombinerede database med 4 eller flere positive noder er klassificeret som værende høj risiko. Tabel 20 viser 10-års DRFS-frekvenserne for disse patienter.

Tabel 20: 10-års DRFS-frekvenser for patienter med 4 eller flere positive noder

Risikogruppe	Antal patienter	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Høj	103	39	57,4 % [46,3 % - 67,0 %]

Hovedparten af forsøgspersoner i de kombinerede undersøgelser (96 %) var enten Luminal A eller Luminal B. Figur 18 viser en sammenligning af DRFS efter luminal undertype for nodenegative patienter.

Figur 18: Kaplan-Meier-kurver for DRFS efter intrinsisk undertype for nodenegative patienter

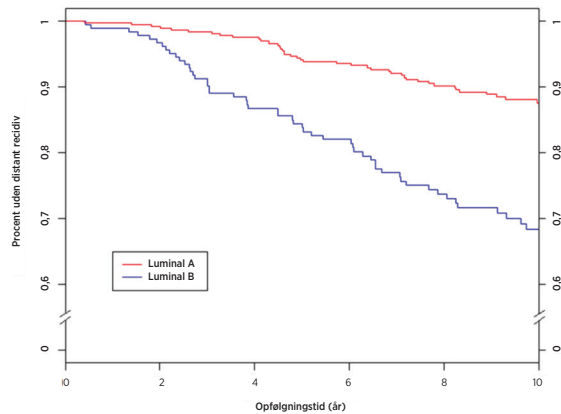


Oversigt over data i Figur 18: Kaplan-Meier-kurver for DRFS efter intrinsisk undertype for nodenegative patienter

Risikogruppe	Antal patienter	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Luminal A	1254	62	94,6 [93,1 - 95,8]
Luminal B	460	75	81,9 [77,7 - 85,3]
Total	1.714	137	

Figur 19 viser samme sammenligning for nodepositive patienter med 1-3 positive noder. I begge grupper var der betydelige forskelle mellem DRFS for Luminal A- og Luminal B-patienter.

Figur 19: Kaplan-Meier-kurver for DRFS efter intrinsisk undertype for nodepositive patienter med 1-3 positive noder



Oversigt over data i Figur 19: Kaplan-Meier-kurver for DRFS efter intrinsisk undertype for nodepositive patienter med 1-3 positive noder

Risikogruppe	Antal patienter	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Luminal A	375	41	87,6 [83,5 - 90,8]
Luminal B	186	52	68,3 [60,4 - 75,0]
Total	561	93	

Der var kun 98 patienter af Luminal-type i den kombinerede database med 4 eller flere positive noder. Tabel 21 viser 10-års DRFS-frekvenserne for disse patienter, der også har en meget større risiko, hvis de har en Luminal B-undertype.

Tabel 21: 10-års DRFS-frekvenser for patienter med 4 eller flere positive noder af Luminal-undertype

Risikogruppe	Antal patienter	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Luminal A	62	17	68,3 [53,6 - 79,3]
Luminal B	36	20	38,0 [21,4 - 54,5]
Total	98	37	

Analyse af sen recidiv

I de tidligere beskrevne kombinerede analysedata er begivenhedsfrekvenserne i hver risikogruppe ikke konstante over 10-års intervallet, som angivet i Figur 16B og 17B. For bedre at forstå DR i perioden for sen recidiv blev der udført en retrospektiv post hoc-analyse af de ovenfor beskrevne kombinerede data for det undersæt af patienter, som var fri for distant recidiv i en femårs periode (samlet 2.163 patienter⁹). Af disse var 1.605 nodenegative patienter, og 488 var nodepositive patienter (1-3 positive noder). For hver nodegruppe viser værdierne på X-aksen ved år 5 i Figur 20 og 21 antallet af patienter efter risikogruppe i fare efter fem år, dvs. valgbare til analysen af sen recidiv.

Tabel 22 viser en opsummering af behandlingen og de kliniske karakteristika for de nodenegative og nodepositive patienter (1-3 noder) i analysen af sen recidiv.

Tabel 22: Opsummering af behandling og kliniske karakteristika for analyse af sen recidiv

Karakteristika	Værdi	Nodenegativ (n = 1605)		Nodepositiv (1-3 noder) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	ransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Behandling	Noget Anastrozol	480	346	153	89
	Kun Tamoxifen	464	315	158	88
Klasse	Sund	192	158	46	36
	Moderat	752	394	265	105
	Ringe	0	109	0	36
Tumor- størrelse	≤ 1 cm	204	116	35	11
	1-2 cm	526	376	165	74
	2-3 cm	183	139	90	64
	>3 cm	31	30	21	28
HER2- status	Negativ	888	590	300	157
	Positiv	56	71	11	20
Recidiver	Distant	41	40	28	29
	Enhver	71	78	37	37
NanoString- intrinsisk undertype	Luminal A	674	488	218	112
	Luminal B	245	150	87	54
	Basal-lignende	4	5	0	1
	HER2-beriget	21	18	6	10

Det primære mål var at evaluere muligheden for, at ROR-resultatet gav betydelige yderligere prognoseoplysninger for DRFS ud over de kliniske standardvariabler i årene 5 til 10. En nulmodel bestående af CTS alene blev sammenlignet med en alternativ model bestående af CTS og ROR ved at bruge en sandsynlighedsforholdstest (LR). ROR tilføjede statistisk signifikante oplysninger for DRFS efter 5 år ud over de kliniske standardvariabler for alle patienter (p < 0,0001) samt for nodenegative (p < 0,0001) og nodepositive patienter (1-3 noder) (p < 0,0001).

I tabel 23 vises en opsummering af fareforholdene for en 10 punkts ændring baseret på en univariat analyse og på en multivariat analyse, der inkluderede både ROR-resultatet og CTS. Fareforholdene for ROR-resultatet er alle betydeligt forskellige fra 1. Det gælder selv efter justering for CTS. Der vises også C-indeks i Tabel 22. For begge grupper var C-indekset betydeligt anderledes end ingen-oplysningsværdien på 0,5.

Tabel 23: Opsummering af test af sen recidiv

Antal positive noder	N	Fareforhold: 10 point ændring i ROR-resultat		C-indeks med 95 % konfidensintervaller		
		Univariat analyse	Multivariat analyse	C-indeks	Nederste	Øverste
0	1.605	1,38 [1,23 - 1,54]	1,29 [1,15 - 1,46]	70,1 %	64,7 %	75,5 %
1-3	488	1,43 [1,25 - 1,63]	1,34 [1,16 - 1,53]	71,1 %	64,0 %	78,3 %

Hovedparten af patienterne i de to undersøgelser var HER2-negative. Tabel 24 viser fordelingen af HER2-status for de nodenegative og nodepositive kvinder (1-3 noder). For begge grupper var mere end 90 % af kvinderne i undersøgelserne HER2-negative.

Tabel 24: Fordeling af HER2-status efter antal af positive noder

Patientundersæt	HER2-status		Total
	Negativ	Positiv	
Nodenegative patienter	1.478 (92,1 %)	127 (7,9 %)	1.605
Nodepositive patienter med 1-3 positive noder	457 (93,6 %)	31 (6,4 %)	488

Tabel 25 viser en sammenligning af den multivariate model tilpasset til alle patienter i en given nodegruppe og modellen tilpasset til alle HER2-negative patienter i gruppen. Der er ingen statistisk signifikante forskelle.

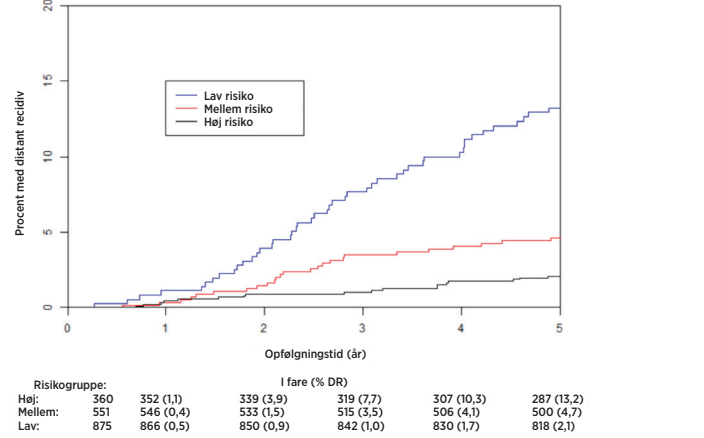
Tabel 25: Multivariate fareforhold for 10 punkt ændring i ROR-resultat: Alle patienter i undergruppe i forhold til HER2-negative patienter i undergruppe

Antal positive noder	Alle patienter [95 % CI]	HER2-negative patienter [95 % CI]
Nodenegative patienter	1,29 [1,15 - 1,46]	1,35 [1,19 - 1,54]
Nodepositive patienter med 1-3 positive noder	1,34 [1,16 - 1,53]	1,29 [1,11 - 1,50]

Sammenligningen på tværs af risikogrupper undersøges nærmere i Figur 20 og 21, som viser incidenskurver for tidlig og sen distant recidiv opbygget efter risikogruppe i hhv. nodenegative og nodepositive patienter (1-3 noder). Incidenskurverne dækker den tidlige recidivperiode (i de første 5 år) og den sene recidivperiode (mellem 5 og 10 år efter diagnose). Umiddelbart under X-aksen viser hver figur antallet af kvinder i fare og den kumulative incidens. Opsummeringstabellerne under figurerne viser konfidensintervallerne for den kumulative DR-frekvens ved 5 år og 10 år for de kvinder, der var DR-fri efter fuldførelsen af 5 års behandling. For de nodepositive patienter (1-3 noder), der vises i Figur 21, er grupperne for lav risiko og mellem risiko blevet kombineret på grund af det lave antal patienter i lavrisikogruppen.

Lavrisikopopulationen har lav sandsynlighed for recidiv mellem år 5 og 10 efter 5 års endokrinbehandling, som demonstreret af de kumulative incidenskurver og de tilknyttede fareforhold for hver risikogruppe. I modsætning har populationerne med mellem og høj risiko en permanent risiko for sen distant recidiv efter 5 års endokrinbehandling. Forskellen i resultat mellem de nodenegative populationer med mellem og høj risiko blev fastlagt i løbet de første 5 år (DR-frekvens = 13,2 % [9,6 % - 16,7 %] for patienter med høj risiko og 4,7 % [2,9 % - 6,4 %] for patienter med mellem risiko) og består frem til 10 år. Dog er recidivfrekvenserne for mellemrisikogruppen og højriskogruppen meget lignende efter 5 års endokrinbehandling.

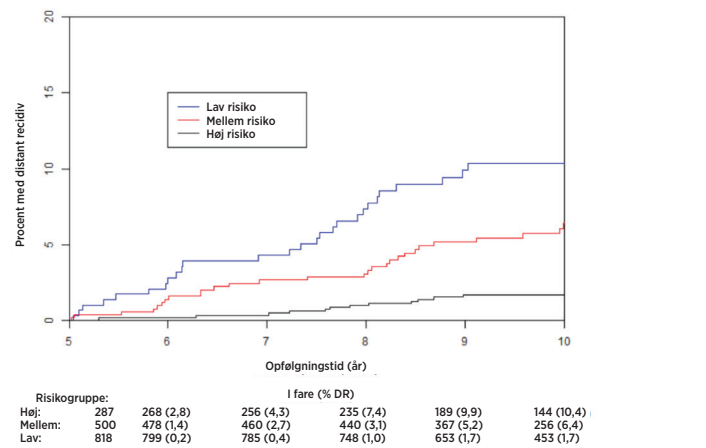
Figur 20A: Incidenskurver for distant recidiv efter risikogruppe fra 0-5 år: Nodenegative patienter



Overzicht over data i Figur 20A: Incidenskurver for distant recidiv efter risikogruppe fra 0-5 år: Nodenegative patienter

DR-frekvenser efter risikogruppe op til fem års fuldførelse af behandling [95 % konfidensintervaller]		
Høj	Mellem	Lav
13,2 % [9,6 % - 16,7 %]	4,7 % [2,9 % - 6,4 %]	2,1 % [1,1 % - 3,1 %]

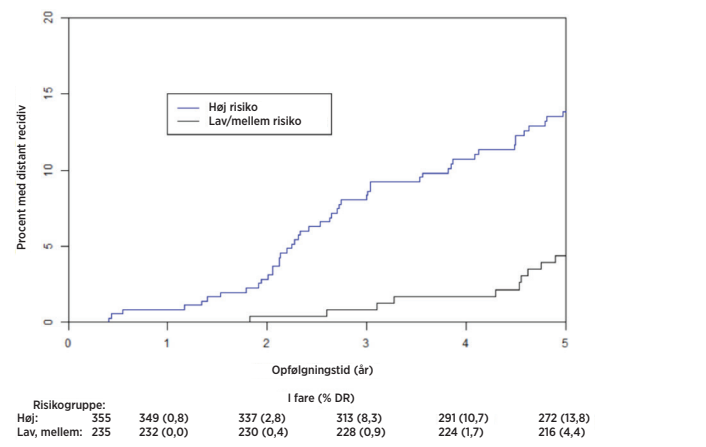
Figur 20B: Incidenskurver for distant recidiv efter risikogruppe fra 5-10 år: Nodenegative patienter



Overzicht over data i Figur 20B: Incidenskurver for distant recidiv efter risikogruppe fra 5-10 år: Nodenegative patienter

DR-frekvenser efter risikogruppe efter DR-fri fuldførelse af behandling [95 % konfidensintervaller]		
Høj	Mellem	Lav
10,4 % [6,6 % - 14 %]	6,4 % [4,1 % - 8,7 %]	1,7 % [0,8 % - 2,6 %]

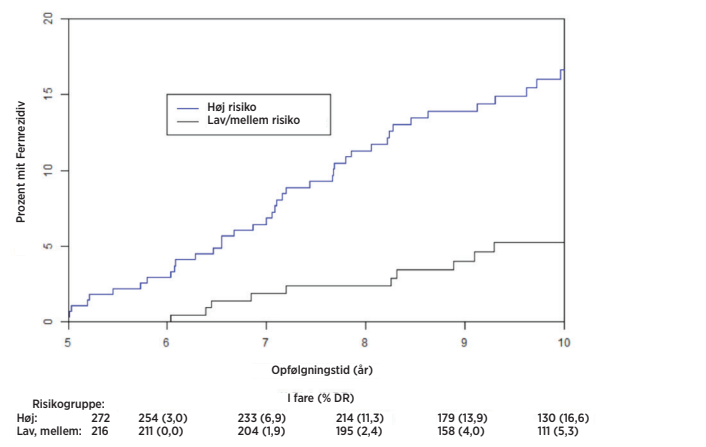
Figur 21A: Incidenskurver for distant recidiv efter risikogruppe fra 0-5 år: Nodepositive (1-3 noder) patienter



Overzicht over data i Figur 21A: Incidenskurver for distant recidiv efter risikogruppe fra 0-5 år: Nodepositive (1-3 noder) patienter

DR-frekvenser efter risikogruppe op til fem års fuldførelse af behandling [95 % konfidensintervaller]	
Høj	Lav / Mellem
13,8 % [10,1 % - 17,4 %]	4,4 % [1,7 % - 7,0 %]

Figur 21B: Incidenskurver for distant recidiv efter risikogruppe fra 5-10 år: Nodepositive (1-3 noder) patienter



Overzicht over data i Figur 21B: Incidenskurver for distant recidiv efter risikogruppe fra 5-10 år: Nodepositive (1-3 noder) patienter

DR-frekvenser efter risikogruppe efter DR-fri fuldførelse af behandling [95 % konfidensintervaller]	
Høj	Lav / Mellem
16,6 % [11,7 % - 21,3 %]	5,3 % [2,0 % - 8,4 %]

Konklusioner for kombineret analyse

ROR-resultatet blev påvist at tilføje betydelige prognoseoplysninger i den sene recidivperiode mellem 5 og 10 år efter diagnose og kliniske variabler over standard i den kombinerede undersøgelse for patienter, der var fri for distant recidiv gennem 5 år. Ved brug af risikogrupper, der blev defineret ved udgangspunktet for hver af de nodetalt specifikke kohorter, blev risikogrupperne vist at klassificere det fulde sæt patienter i grupper med betydelig forskellig risiko for sen distant recidiv. Både de kontinuerlige og ROR-resultatbaserede risikogruppeanalyser viste lignende prognoseoplysninger i forskellige undergrupper. Der blev ikke observeret nogen væsentlige forskelle mellem resultaterne for HER2-negative patienter og alle patienter.

I begge undersøgelserne, TransATAC og ABCSG-8, blev ROR demonstreret at bidrage betydelig prognostiske oplysninger ud over de kliniske og behandlingsmæssige standardvariabler, både når de blev inkluderet som en kontinuerlig måling, og når de blev inkluderet vha. tre foruddefinerede risikogrupper. De to undersøgelser havde forskellige risikoprofiler i den forstand, at begivenhedsfrekvensen var højere i TransATAC-undersøgelsen end i ABCSG-8-undersøgelsen: Dette ses tydeligt ved at sammenligne dem DRFS (%) i kontrolgruppen af ATAC (90,8 %) og ABCSG8 (92,5 %), som blev rapporteret i litteraturen^{9,10}. Denne analyse kombinerede dataene fra de to undersøgelser med samme vægtning for at generere risikoprofiler, der forventes at være mere generaliserbare til andre patientpopulationer end resultaterne fra de individuelle undersøgelser.

Undersøgelse 1: Forudsigelse af risiko for distant recidiv hos postmenopausale kvinder med nodenegativ eller nodepositiv, hormonreceptorpositiv brystkræft i tidlig fase, som behandles med Arimidex eller Tamoxifen: en TransATAC-undersøgelse.

Undersøgellesdesign

Den kliniske valideringsundersøgelse var designet til at validere, at recidivrisikoresultatet (ROR) giver yderligere prognostiske oplysninger for distant recidiv-fri overlevelse (DRFS) ud over kliniske standardvariabler gennem brug af alle tilgængelige patientprøver. I denne undersøgelse blev brugt RNA, der blev isoleret fra FFPE-brystkræftvæv fra et undersæt af patienter, der deltog i ATAC-forsøget¹¹. ATAC-forsøget inkluderede 9.366 patienter på tværs af tre forsøgsdele (1:1:1), hvor patienter blev randomiseret til at modtage 5 års endokrinbehandling med 1 mg Anastrozol (dvs. Arimidex) plus en tamoxifen-placebo, 20 mg Tamoxifen plus Anastrozol-placebo eller en kombination af Tamoxifen/Arimidex. Gruppen med kombinationsbehandling blev standset efter den indledende analyse, fordi der ikke blev set nogen effektivitets- eller tolerabilitetsfordele i forhold til Tamoxifen alene. En 10 års median opfølgning på ATAC-forsøgets monobehandlingsdel blev for nyligt rapporteret at opfylde FDA-kravene til opdateret sikkerheds- og effektivitetsoplysninger⁹. For hormonreceptorpositive patienter var der en betydelig forbedring i DFS (HR = 0,86), RFS (HR = 0,79) og DRFS (HR = 0,85) for de patienter, der blev behandlet med Anastrozol til sammenligning med Tamoxifen i denne analyse. De absolutte forskelle i distant recidiv-fri overlevelse mellem Anastrozol og Tamoxifen blev forøget over tid fra 2,7 % efter 5 år til 4,3 % efter 10 år. TransATAC-projektet blev startet i 2002 under TA/O1-protokollen for at etablere en vævsbank fra arkiverede histopatologiske FFPE-blokke fra ATAC-patienter retrospektivt¹¹.

Der blev opnået samlet 2.006 blokke fra de 4.160 kvinder med hormonreceptorpositiv brystkræft, som blev randomiseret til monobehandlingsdelen af ATAC-forsøget. Af disse FFPE-blokke blev 1.372 indsamlet fra patienter i Storbritannien og indeholdt tilstrækkeligt invasiv tumor til analyse vha. Genomic Health® Oncotype Dx®-testen¹². Oncotype Dx Recurrence Score® (RS) blev bestemt ud fra FFPE-blokke, og undersøgelsesresultaterne validerede klinisk recidiv-resultatet (RS) for at anslå distant recidiv-fri overlevelse hos postmenopausale kvinder med HR+ brystkræft, som modtog behandling med Anastrozol eller Tamoxifen. Den resterende DNA fra Oncotype Dx-undersøgelsen blev sendt til Royal Marsden Hospital i London, hvor det blev opbevaret ved -70 °C. Et samlet antal på 1017 patienter fra Oncotype Dx-undersøgelsen havde >500 ng RNA tilbage og blev testet af NanoString som del af NanoStrings kliniske valideringsundersøgelse.

I denne undersøgelse blev benyttet intrinsiske undertyper, der blev genereret af analysen, og to versioner af ROR-resultatet blev evalueret vha. en foruddefineret sekventiel tilgang. De to forskellige ROR-resultater, som hver går fra 0-100, blev beregnet ved at bruge enten alle 50 testgener, som tidligere publiceret² eller et 46-gens undersæt. I begge tilfælde blev koefficienterne beregnet ud fra en Cox-model, der omfatter Pearson-korrelationen for de 50 eller 46 gener, der blev brugt til at beregne hver intrinsiske undertype, et spredningsresultat og tumorstørrelse. Alle analyser blev udført på 10-års opfølgingsdata.

Det primære slutpunkt var distant recidiv-fri overlevelse (DRFS). Dette blev defineret som intervallet fra diagnose til distant recidiv eller død pga. brystkræft. Det sekundære slutpunkt var recidiv-fri overlevelse (RFS). Dette blev defineret som intervallet fra diagnose til første recidiv (lokal, regional eller distant) eller død pga. brystkræft.

Med brug af alle tilgængelige patientprøver blev multivariate Cox-modeller for proportionale farer (PH) monteret for at evaluere det primære mål i sekventielle test af ROR baseret på 50 og 46 gener. Modellen inkluderede de kliniske standardkovarianter (alder, tumorklasse, tumorstørrelse, nodalstatus, adjuvant behandling). Derefter blev monteret en Cox-model, og en sandsynlighedsforholdstest blev brugt til at teste, om ROR bidrog med statistisk signifikante ($\alpha = 0,05$) yderligere prognostiske oplysninger ud over det, der var indeholdt i det kliniske behandlingsresultat (CTS – Clinical Treatment Score). CTS er en optimeret kombination af klinisk-patologiske faktorer, der blev udviklet af den kliniske forsker som et mål for standardpatologi¹². De primære analyser blev gentaget for forskellige patientundersæt (alle, nodenegative, nodepositive eller kun HER2 negativ) og slutpunkter (DRFS eller RFS).

For hver af de nodenegative og nodepositive patienter blev brugt Cox-modeller (med udelukkelse af CTS) til at forudsige 10-års risikoen for distant recidiv som en funktion af ROR. På grundlag af disse modelforudsigelser blev tre risikogrupper defineret som:

- Lav risiko:
- < 10 % risiko for DR efter 10 år
- Mellem risiko:
- 10-20 % risiko for DR efter 10 år
- Høj risiko:
- > 20 % risiko for DR efter 10 år

Analyse

Der blev genereret Kaplan-Meier-plots for hver risikogruppe. Sandsynlighedsforholdstest (brugt til se, om to statistiske modeller passer sammen), som beskrevet i den primære analyse, blev udført for Genomic Health's Oncotype Dx-test (Recidivresultat (RS – Recurrence Score)) og den primære forskers immunohistokemi-baserede test (IHC4). Disse resultater blev sammenlignet med dem, der blev opnået for ROR, for at afgøre den udstrækning, hvormed hvert resultatsystem giver yderligere prognostiske oplysninger ud over CTS. IHC4-resultaterne diskuteres ikke yderligere, da de er vanskelige at sammenligne med andre analyser, fordi IHC4-testen blev indstillet ved at bruge TransATAC-undersøgelsesdata.

Table 26: Oversigt over demografiske og kliniske karakteristika

Karakteristika	Aktuel undersøgelse (n = 1,007)		Indledende undersøgelse, hvorfra RNA blev opnået (n = 1,231)	Enkeltmiddel-delen af ATAC ikke inkluderet (n = 2,929)
	Antal patienter	% patienter		
Nodalstatus				
Negativ	701	70 %	71 %	68 %
Positiv	268	27 %	25 %	25 %
Ukendt	38	4 %	4 %	7 %
Tumorstørrelse				
≤ 1 cm	138	14 %	67 %	70 %
1-2 cm	523	52 %		
2-3 cm	253	25 %	33 %	30 %
>3 cm	93	9 %		
Tumorklasse				
Sund	213	21 %	27 %	25 %
Moderat	601	60 %	57 %	59 %
Ringe	193	19 %	16 %	17 %
Alder				
Middel	64,4 år		64,3	66,1

Table 27: Yderligere kliniske karakteristika

Karakteristika	Antal patienter	% af patienter
Undertype		
Basal-lignende	9	1 %
HER2-beriget	41	4 %
Luminal A	692	69 %
Luminal B	265	26 %
Behandling		
Anastrozol	513	51 %
Tamoxifen	494	49 %
Recidiver		
Enhver	210	21 %
Distant	160	16 %
HER2-status		
Negativ	888	88 %
Positiv	119	12 %

Resultater

Primær analysetest demonstrerede, at ROR-resultat giver yderligere prognostiske oplysninger for distant recidiv-fri overlevelse ud over kliniske standardvariabler (CTS). Alle rapporterede ROR-data, der følger, er baseret på 46 gener, da dette er grundlaget for ROR, som rapporteret af Prosigna-analysen.

Table 28: Primær analysetest af ROR

Nul-model	Alternativ model	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-værdi
CTS	CTS + ROR	34,21	P <0,0001

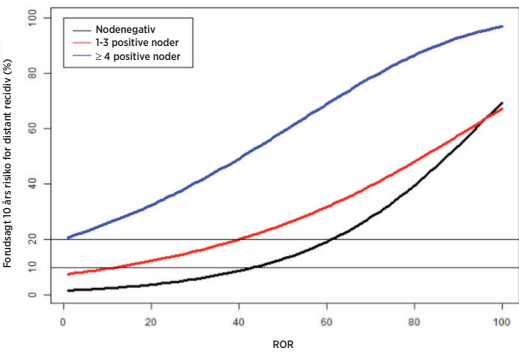
Sekundære analyser demonstrerede, at ROR er signifikant relevant for distant recidiv-fri overlevelse og bidrager med prognoseoplysninger ud over CTS i flere kliniske relevante undergrupper.

Table 29: Gentagelse af primære analysetest for foruddefinerede undergrupper

Emnegruppe	Slutpunkt	Antal patienter	Antal begivenheder	CTS+ROR ift. CTS	
				$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-værdi
Alle	DRFS	1007	160	34,2	<0,0001
	RFS	1007	210	31,2	<0,0001
HER2-negativer	DRFS	888	131	28,9	<0,0001
	RFS	888	179	26,9	<0,0001
Nodenegativer	DRFS	739	79	25,0	<0,0001
	RFS	739	117	21,5	<0,0001
Nodepositiver	DRFS	268	81	9,3	0,0023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
HER2- Negativ node - Negativer	DRFS	649	62	24,6	<0,0001
	RFS	649	98	20,8	<0,0001

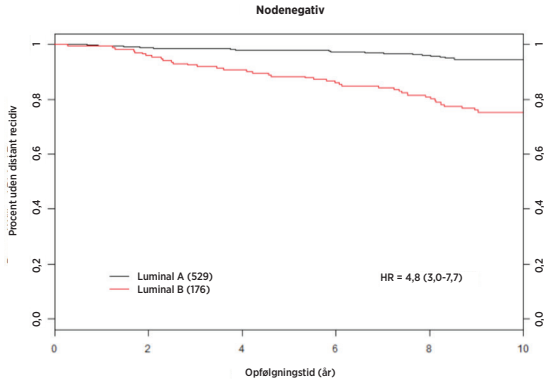
Primære og sekundære analyser viste, at ROR var kontinuerligt relateret til DRFS for alle patienter og i alle undergrupper.

Figur 22: 10 års forudsagt distant recidivrisiko anslået vha. analyse af ROR-resultat i nodalstatusgruppe

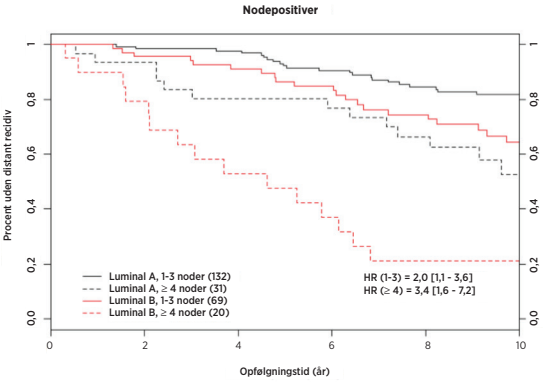


Sekundære analyser demonstrerede, at Luminal A- og Luminal B-undertyperne havde statistisk signifikante forskellige resultater i hver undergruppe af patienter defineret af nodalstatus.

Figur 23: Kaplan-Meier-kurver for DRFS efter intrinsisk undertype for nodenegative patienter efter intrinsisk undertype

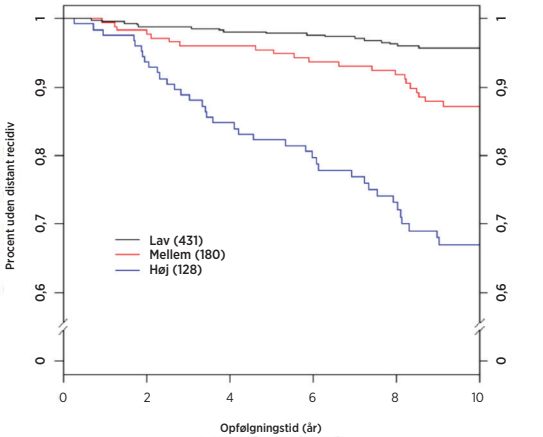


Figur 24: Kaplan-Meier-kurver for DRFS for nodepositive patienter efter intrinsisk undertype



Figur 25 og 26 demonstrerer, at i hver nodalkategori var den absolutte kliniske risiko for de patienter, der blev forudsagt at have lav risiko, betydeligt forskellig fra den absolutte kliniske risiko for patienter, der blev forudsagt at have høj risiko: De patienter, der blev forudsagt at have lav risiko, havde observeret 10-års DR-frekvenser på mindre end 10 %, mens de patienter, der blev forudsagt at have høj risiko, havde observeret 10 års DR-frekvenser på mere end 30 %.

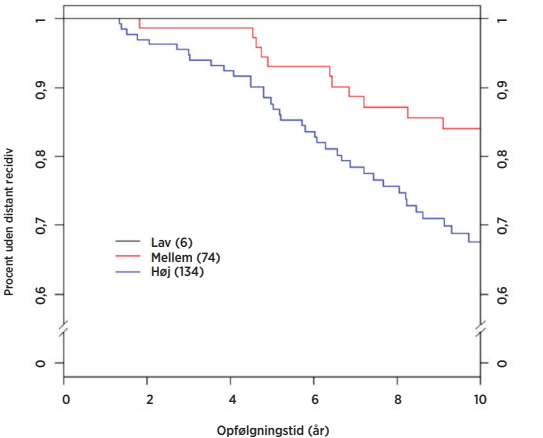
Figur 25: DRFS efter risikogruppe for nodenegative patienter med udelukkelse af CTS



Oversigt over data i Figur 25: DRFS efter risikogruppe for nodenegative patienter med udelukkelse af CTS

Risikogruppe	Antal patienter (%)	Antal Begivenheder	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Lav	431 (58 %)	17	96 % [94 % - 98 %]
Mellem	180 (24 %)	22	86 % [81 % - 92 %]
Høj	128 (17 %)	38	67 % [59 % - 76 %]
Total	739 (100 %)	77	

Figur 26: DRFS efter risikogruppe for patienter med 1 til 3 positive noder uden CTS



Oversigt over data i Figur 26: DRFS efter risikogruppe for patienter med 1 til 3 positive noder uden CTS

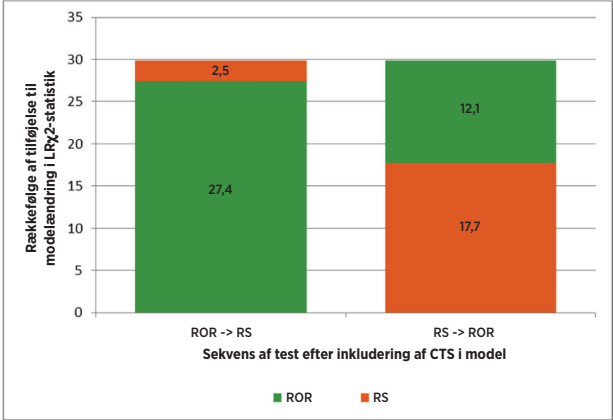
Risikogruppe	Antal patienter (%)	Antal Begivenheder	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Lav	6 (3 %)	0	100 % [1/1]
Mellem	74 (35 %)	11	84 % [76 % - 93 %]
Høj	134 (63 %)	38	68 % [59 % - 77 %]
Total	214 (100 %)	49	

Sammenligning af ROR med RS

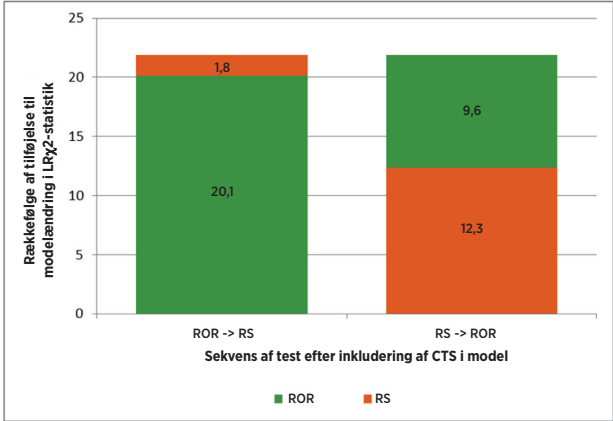
Af de 1.007 prøver med ROR-resultater, var der Oncotype Dx-testresultater tilgængelige for alle 1.007 prøver, men IHC-resultater var kun tilgængelige for 940 prøver. For at muliggøre en sammenligning af alle tre test er resultaterne i dette afsnit baseret på de 940 prøver, der havde testresultater for alle tre metoder (dog er IHC4 ikke rapporteret her). Sandsynlighedsforholdstest præsenteres for tilføjelsen af en enkelt variabel, hvilket betyder, at for at tilføjede oplysninger skal være statistisk signifikante ($\alpha = 0,05$), skal ændringen i statistikken for 1-frihedsgrad χ^2 være større end 3,84. Tallene nedenfor viser de oplysninger, der blev tilføjet, da prognosetesten blev føjet til en anden prognosetest plus CTS i rækkefølge. Ved hver tilføjelse måles de tilføjede oplysninger af ændringen i χ^2 .

ROR føjet til RS ud over CTS: prognostiske oplysninger

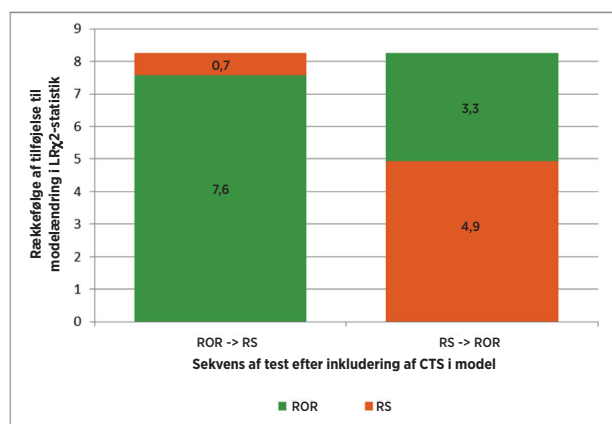
Figur 27: Prognoseoplysninger for DRFS ud over CTS hos alle patienter (n = 940)



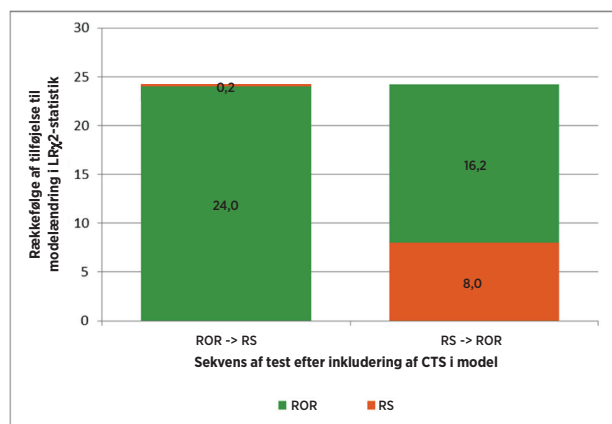
Figur 28: Prognoseoplysninger for DRFS ud over CTS hos nodenegative patienter (n = 683)



Figur 29: Prognoseoplysninger for DRFS ud over CTS hos nodepositive patienter (n = 257)



Figur 30: Prognoseoplysninger for DRFS ud over CTS hos nodenegative HER2-negative patienter (n = 649)



Figur 27 til og med 30 viser de oplysninger, der blev tilføjet ud over CTS, da de to prognosetest blev føjet til i rækkefølge. Ved hver tilføjelse måles de tilføjede oplysninger af ændringen i χ^2 -statistikken. Når ROR f.eks. var den første test, der blev tilføjet efter inkluderingen af CTS (alle patientdata), var χ^2 -statistikken 27,4. Med CTS og ROR i modellen gav tilføjelsen af recidivresultatet (RS) en ændring i χ^2 -statistikken på 2,5, hvilket ikke er signifikant (kritisk værdi for χ^2 -test med 1 frihedsgrad er 3,84); dvs., at når CTS og ROR begge er i modellen, tilføjer RS ikke nogen signifikante oplysninger. Hvis RS dog var den første test, der blev tilføjet, var der stadig oplysninger i ROR, der ikke blev inkluderet i kombinationen af CTS og RS. Begge test viste prognostisk signifikans, når de blev føjet til CTS for nodepositive patienter, men ingen af testene viser signifikans som en anden tilføjet test, muligvis på grund af den mindre prøvestørrelse. For det nodenegative, HER2-negative patientundersæt følger RS ikke nogen signifikante prognostiske oplysninger til CTS + ROR. På den anden side følger ROR signifikante prognostiske oplysninger til CTS + RS.

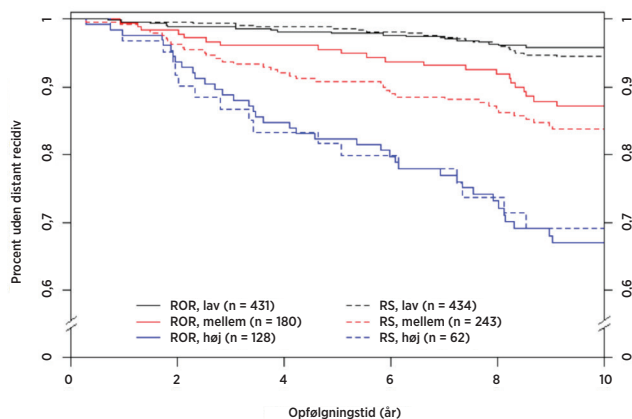
ROR ift. RS: resultat af risikogrupper

For at sammenligne, hvordan de to test separerede patienter i forhold til risikoen, blev risikogrupper defineret ud fra hver tests vurdering af risikoen for distant recidiv ved 10 år inden for TransATAC-populationen. Der blev valgt risikoresultattærskler til definering af risikogrupperne for hver test baseret på resultaterne af vores TransATAC-undersøgelse for at definere risikogrupper, der omfatter patienter med samme risiko. For at opnå disse sammenlignelige risikogrupper var de afskæringspunkter, der blev brugt til Oncotype Dx anderledes end dem, der blev brugt af Genomic Health. For hver test blev lavrisikogruppen efterfølgende defineret som patienter med mindre end en 10 % anslået risiko for recidiv. For hver test blev mellemrisikogruppen efterfølgende defineret som patienter med en anslået risiko for recidiv mellem 10 % og 20 %. For hver test blev højriskogruppen efterfølgende defineret som patienter med større end en 20 % anslået risiko for recidiv. I figuren nedenfor opsummeres størrelserne og resultaterne for de risikogrupper, der er defineret af hver test.

Figur 31 illustrerer det resultat, at Prosigna tildelte 26 % færre patienter til mellemrisikogruppen end Oncotype Dx gjorde (180 patienter i forhold til 243 patienter). Desuden tildelte Prosigna flere patienter til højriskogruppen end Oncotype Dx gjorde. Dog har lavrisikogruppen og højriskogruppen, som blev

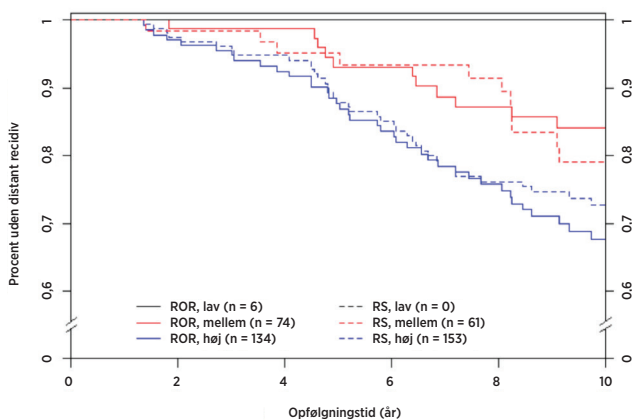
defineret af hver test, lignende resultater, som illustreret af de overlappende Kaplan-Meier-kurver. Denne observation fik de uafhængige forskere i vores TransATAC-undersøgelse til at konkludere, at Prosigna tildelte færre patienter til mellemrisikogruppen end Oncotype Dx gjorde med tilsvarende eller højere separation mellem lav- og højriskogrupperne.

Figur 31: Prosignas ROR-resultat identificerede væsentligt flere højriskopatienter og færre mellemrisikopatienter end Oncotype Dx's RS-resultat for nodenegative patienter.



Når der kun bruges ROR hos nodepositive patienter med 1-3 positive noder, var der forudsagt, at 6 patienter ville have en < 10 % risiko for distant recidiv. Ingen af disse patienter havde begivenheder i løbet af undersøgelsen. En af disse patienter blev observeret i 7,9 år, og alle andre havde ingen distant recidiv i de mindst 9,9 års opfølgning, hvilket angiver, at de nodepositive patienter, der blev forudsagt at have lav risiko, rent faktisk havde lav risiko. Log-klassificeringstestene blev ikke brugt til sammenligning, da der ikke var nogen lavrisikogruppe for RS.

Figur 32: Sammenligning af 10-års DRFS risikogruppeklassificering uden brug af CTS: Nodepositive patienter (1-3 noder) (ROR ift. RS)



Konklusioner af klinisk undersøgelse 1

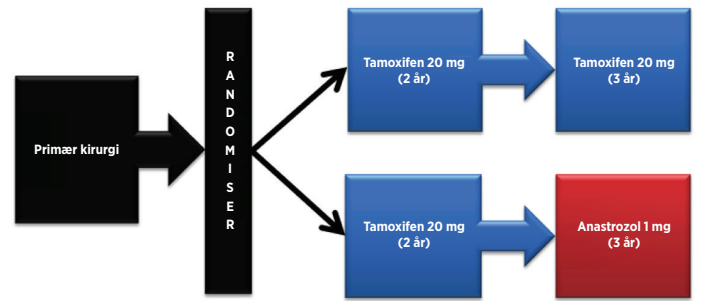
Den primære analyse viste, at ROR bidrog signifikante prognoseoplysninger ud over de kliniske standardkovanter (CTS) hos alle patienter og i alle foruddefinerede klinisk relevante undergrupper. ROR blev påvist at underindele patienter i 3 grupper, der har statistisk signifikant forskellige resultater hos de nodenegative patienter. De intrinsiske Luminal A- og Luminal B-undertyper blev påvist at have betydelig forskellig DRFS og RFS uafhængigt af nodalstatus. Til sammenligning med den prognostiske indikator RS (21-gens recidivresultat fra Oncotype Dx) bidrog ROR med prognoseoplysninger ud over RS hos alle patienter og i kliniske relevante undergrupper. I den nodenegative gruppe fordoblede ROR desuden antallet af patienter, der var tildelt til højriskogruppen, og reducerede væsentligt antallet af patienter, der var tildelt til mellemrisikogruppen, uden at reducere forskellene i resultater mellem lav- og højriskogrupperne i forhold til RS.

Undersøgelse 2: Prognose for hormonreceptorpositiv hos postklimakterielle kvinder med brystkræft, som modtager adjuvant systemisk endokrinbehandling alene vha. Prosigna-analysen: en ABCSG-8-undersøgelse.

Undersøgelingsdesign

Undersøgelseskohorten består af prøver af FFPE-brystkræftvæv, der blev indsamlet retrospektivt og arkiveret i ABCSG-tumorbanken fra patienter, der blev føjet til ABCSG-8-forsøget mellem 1996 og 2004¹³. Samlet 3.901 postklimakterielle kvinder med HR+ brystkræft i en tidlig fase blev randomiseret før behandling til to år med adjuvant Tamoxifen efterfulgt af tre års Arimidex® (anastrozol) eller fem års adjuvant Tamoxifen. Forsøgets behandlingsstruktur er vist i Figur 33.

Figur 33: Skema over undersøgelingsdesignet for ABCSG-8-forsøget



Valideringskohorten repræsenterer den fraktion af den evaluerbare ABCSG-8-kohorte, for hvilken vævsprøver kunne indsamles fra den retrospektivt arkiverede ABCSG-tumorbank, og for hvilken informeret samtykke kunne opnås, eller patienten var død. Patienter, der opfyldte valgbarhedskriterierne for det oprindelige forsøg, blev kun udelukkede, enten fordi vævet ikke var tilgængeligt til gennemførelse af NanoStrings analyse, eller der blev ikke opnået fornyet samtykke fra patienten. Alle prøver med en tumorblok og afgivet patientsamtykke blev testet som del af denne undersøgelse.

I denne undersøgelse blev benyttet de intrinsiske undertyper, der blev genereret af analysen, og ROR-resultatet blev evalueret vha. en foruddefineret analyseplan. ROR-resultatet, der går fra 0-100, blev beregnet ved at bruge et 46-gens undersæt fra de 50 testgener, der tidligere blev publiceret². Koefficienterne for ROR blev beregnet ud fra en Cox-model, der omfatter Pearson-korrelationen for de 46 gener, der blev brugt til at beregne hver intrinsiske undertype, et spredningsresultat og samlet tumorstørrelse. Alle analyser blev udført på maksimale opfølgingsdata.

Det primære slutpunkt var distant recidiv-fri overlevelse (DRFS). Dette blev defineret som intervallet fra diagnose til distant recidiv eller død pga. brystkræft. Det sekundære slutpunkt var recidiv-fri overlevelse (RFS). Dette blev defineret som intervallet fra diagnose til første recidiv (lokal, regional eller distant) eller død pga. brystkræft.

Med brug af alle tilgængelige patientprøver blev multivariate Cox-modeller for proportionale farer (PH) monteret for at evaluere det primære mål i sekventielle test af ROR. Modellen inkluderede de kliniske standardkovarianter (alder, tumorklasse, samlet tumorstørrelse, nodalstatus, adjuvant behandling). Derefter blev monteret en Cox-model, og en sandsynlighedsforholdstest blev brugt til at teste, om ROR bidrog med statistisk signifikante ($\alpha = 0,05$) yderligere prognostiske oplysninger ud over det, der var indeholdt i det kliniske behandlingsresultat (CTS – Clinical Treatment Score). CTS er en optimeret kombination af klinisk-patologiske faktorer, der blev udviklet som et mål for standardpatologi¹². De primære analyser blev gentaget for forskellige patientundersæt (alle, nodenegative, nodepositive eller kun HER2 negativ) og slutpunkter (DRFS eller RFS).

Analyse

Der blev brugt en sekventiel tilgang, hvor det primære videnskabelige mål var at demonstrere, at ROR bidrager med signifikante prognoseoplysninger ud over de kliniske standardvariabler. Det primære mål tilføjede et yderligere krav om at demonstrere, at kategorisk risikoklassifikation i én af tre grupper (lav/mellem/høj) tilføjer signifikante prognostiske oplysninger ud over de kliniske standardvariabler. For at opfylde dette krav skulle begge af følgende demonstreres:

- Der skulle påvises, at det kontinuerlige ROR-resultat bidrager prognostisk værdi ud over de kliniske standardvariabler.
- Hvis nul-hypotesen om ingen prognostiske oplysninger afvises, skal påvises, at de ROR-baserede risikokategorier bidrager prognostisk værdi ud over de kliniske standardvariabler.

Med brug af alle tilgængelige patientprøver blev multivariate Cox-modeller for proportionale farer (PH) monteret for at evaluere det primære mål i sekventielle test af ROR efterfulgt af foruddefinerede ROR-baserede risikokategorier. Modellerne inkluderede følgende kategoriske kliniske standardkovariater (med mulige værdier):

- Alder (≥ 65 eller <65)
- Klasse (G1 eller G2/GX)
- Samlet tumorstørrelse (T1, T2/T3)
- Nodalstatus (N0, N+(1-3), N+(≥ 4))
- Adjuvant behandling (Tamoxifen alene eller Tamoxifen → Anastrozol)

hvor N0 angiver nodenegative patienter, N+(1-3) angiver nodepositive patienter med 1-3 positive noder, og N+(≥ 4) angiver nodepositive patienter med 4 eller flere positive noder. T1 angiver en tumor på ≤ 2 cm på tværs, T2 angiver en tumor større end 2 cm, men ikke mere end 5 cm på tværs, og T3 angiver en tumor på mere end 5 cm på tværs. Der var kun 14 T3-prøver i undersøgelsen, så disse blev kombineret med T2-prøverne. De godt differentierede (G1) tumorer blev sammenlignet med kombinationen af moderat differentierede (G2) og GX lobulære tumorer. GX lobulære tumorer blev behandlet som G2-tumorer i denne analyse, fordi G2-tumorer er den mest almindelige klasse i denne patientpopulation til tilsigtet brug.

Disse kovariater indføres i modellen i form af et klinisk behandlingsresultat (CTS). Følgende model blev oprettet for at opnå CTS:

$$\lambda(t) = \lambda_0(t) \exp\left(\sum_j z_j \gamma_j\right)$$

Hvor z 'er repræsenterer de kliniske variabler og behandlingsvariabler, som er angivet ovenfor, og CTS blev defineret vha. estimaterne af de γ 'er, der blev opnået ovenfor; dvs., $CTS = \sum_j z_j \gamma_j$.

Antagelsen om proportionale farer blev testet vha. Schoenfeld-residualer.

Patienter, der blev inkluderet i valideringsundersøgelsen, havde lignende karakteristika som dem i den oprindelige ABCSG-8-undersøgelse.

Tabel 30: Oversigt over kliniske karakteristika

Karakteristika	Værdi	Inkluderet (n = 1,478)		Ikke inkluderet (n = 2,236)		Total (n = 3,714)	
		antal	%	antal	%	antal	%
Behandling	Kun Tamoxifen	741	50,1 %	1108	49,3 %	1.849	49,8 %
	Tamoxifen → Anastrozol	737	49,9 %	1128	50,2 %	1.865	50,2 %
ER-status	Negativ	14	0,9 %	32	1,4 %	46	1,2 %
	Positiv	1.464	99,1 %	2.199	98,3 %	3.663	98,6 %
	Ukendt	0	0,0 %	5	0,2 %	5	0,1 %
Klasse	G1	271	18,3 %	468	20,8 %	739	19,9 %
	G2	1.152	77,9 %	1.659	73,9 %	2.811	75,7 %
	GX	55	3,7 %	109	4,9 %	164	4,4 %
Nodalstatus	N0	1047	70,8 %	1723	76,7 %	2.770	74,6 %
	N+(1-3)	382	25,8 %	449	20,0 %	831	22,4 %
	N+(≥ 4)	49	3,3 %	64	2,8 %	113	3,0 %
	Ukendt	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
PgR-status	Negativ	260	17,6 %	424	18,9 %	684	18,4 %
	Positiv	1.218	82,4 %	1.805	80,4 %	3.023	81,4 %
	Ukendt	0	0,0 %	7	0,3 %	7	0,2 %
Tumorfase	T1	1.037	70,2 %	1.745	77,7 %	2.782	74,9 %
	T2	427	28,9 %	472	21,0 %	899	24,2 %
	T3	14	0,9 %	19	0,8 %	33	0,9 %
Alder	Median	63		I/T		64	
	Område	41-79				41 - 80	

* Inkluderer én patient med >9 positive noder

Tabel 31: Yderligere kliniske karakteristika

Karakteristika	Værdi	Antal patienter	% af patienter
NanoString-intrinsisk undertype	Luminal A	1.004	67,9 %
	Luminal B	418	28,3 %
	HER2-beriget	48	3,2 %
	Basal-lignende	8	0,5 %
Recidiver	Distant	155	10,5 %
	Enhver	194	13,1 %
HER2-status	Negativ	1.397	94,5 %
	Positiv	77	5,2 %
	Ukendt	4	0,3 %

Resultater

Af de 1.620 væv, der var tilgængelige til test, bestod 25 (1,5 %) ikke den foruddefinerede patologicvaluering for tilstrækkelig tumor, 73 af de 1.595 vævsprøver (4,6 %) med levedygtigt invasivt væv består ikke foruddefinerede kvalitetskontrolspecifikationer for udtrykket RNA, og 44 af de 1.522 RNS-prøver (2,9 %) opfyldte ikke specifikationerne for kvalitetskontrol for analysen for Prosigna-resultater, hvilket efterlader samlet 1.478 (91,2 %) til analyse.

Af de 1.478 patienter, der er tilgængelige til analyse, havde 155 distante recidiver, og 194 havde lokal eller distant recidiv eller død på grund af brystkræft. Den mediane opfølgning i forsøget var 10 år.

Primær analysetest demonstrerede, at ROR-resultat giver signifikante yderligere prognostiske oplysninger for distant recidiv-fri overlevelse ud over kliniske standardvariabler (CTS).

Tabel 32: Opsummering af primær analysetest

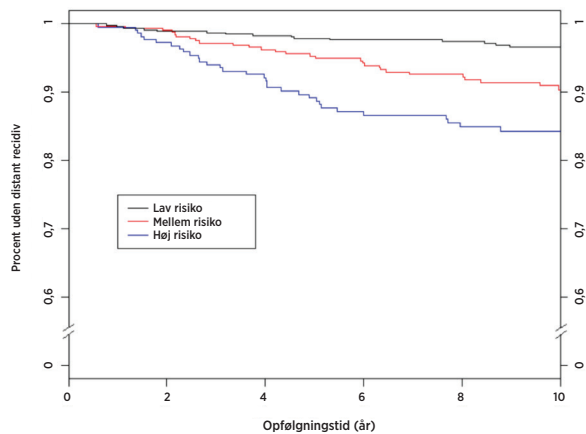
Nul-model	Alternativ model	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 Kritisk værdi (frihedsgrad)	χ^2 p-værdi
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p <0,0001
CTS	CTS + Risikogruppe	34,12	5,99 (df = 2)	p <0,0001

Sekundære analyser demonstrerede, at ROR er signifikant relevant for distant recidiv-fri overlevelse og bidrager med prognoseoplysninger ud over CTS i flere kliniske relevante undergrupper.

Tabel 33: Gentagelse af primære analysetest for foruddefinerede undergrupper

Emnegruppe	Antal patienter	Antal begivenheder	CTS+ROR ift. CTS	CTS+risikogruppe ift. CTS
			$\Delta LR \chi^2$ (krit. værdi= 3,84)	$\Delta LR \chi^2$ (krit. værdi= 5,99)
Alle	1.478	155	53,49	34,12
HER2-negativ	1.397	145	47,50	29,94
NO	1.047	86	25,57	23,36
NO, HER2-negativ	984	79	21,69	20,32
N+(1-3)	382	59	25,99	19,94
N+(1-3), HER2-negativ	367	56	22,75	18,75

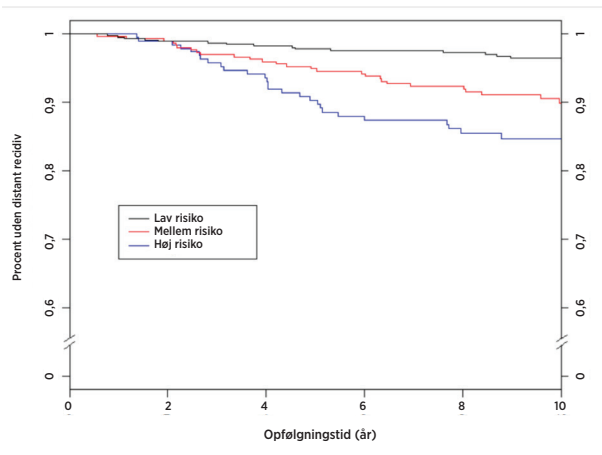
Figur 34: DRFS efter risikogruppe for nodenegative patienter



Overzicht over data i Figur 34: DRFS efter risikogruppe for nodenegative patienter

Risikogruppe	Antal patienter (%)	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Lav	487 (47 %)	15	96,6 % [94,4 % - 97,9 %]
Mellem	335 (32 %)	28	90,4 % [86,3 % - 93,3 %]
Høj	225 (21 %)	32	84,3 % [78,4 % - 88,6 %]
Total	1.047 (100 %)	75	

Figur 35: DRFS efter risikogruppe for HER2-negativ nodenegative patienter

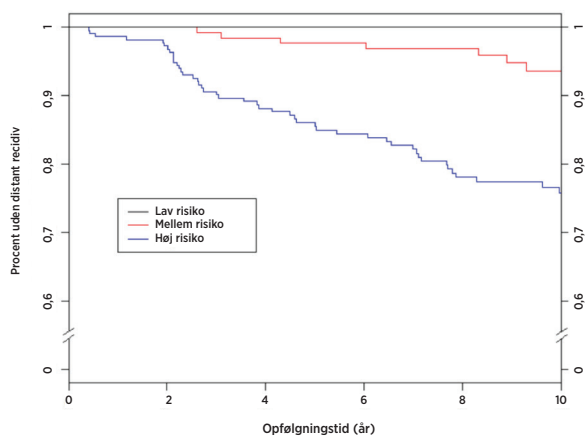


Overzicht over data i Figur 35: DRFS efter risikogruppe for HER2-negativ nodenegative patienter

Risikogruppe	Antal patienter (%)	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Lav	474 (48 %)	15	96,5 % [94,3 % - 97,9 %]
Mellem	311 (32 %)	27	90 % [85,6 % - 93,1 %]
Høj	199 (20 %)	27	84,7 % [78,4 % - 89,3 %]
Total	984 (100 %)	69	

Figur 36 viser Kaplan-Meier-plots efter risikogruppe for nodepositive patienter (1-3 noder), og Figur 37 viser samme plot for nodepositive (1-3 noder) HER2-negativ patienter. Resultaterne med og uden de HER2-positive patienter er lignende.

Figur 36: DRFS efter risikogruppe for nodepositive (1-3 noder) patienter

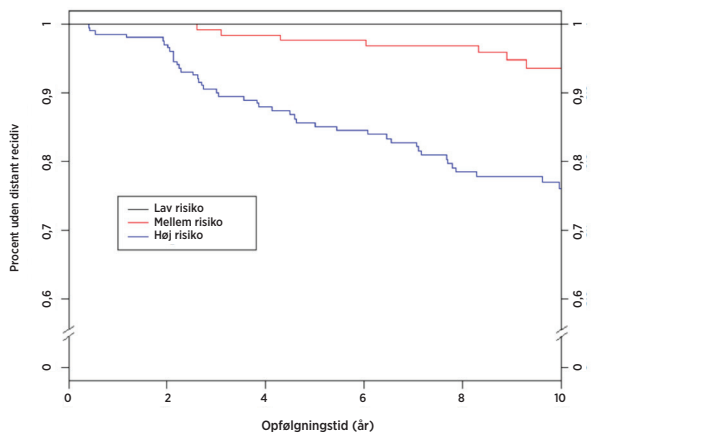


Overzicht over data i Figur 36: DRFS efter risikogruppe for nodepositive (1-3 noder) patienter

Risikogruppe	Antal patienter (%)	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Lav	15 (4 %)	0	100 % [78,2 % - 100 %]*
Mellem	143 (37 %)	7	93,6 % [86,9 % - 97 %]
Høj	224 (59 %)	46	75,8 % [68,9 % - 81,4 %]
Total	382 (100 %)	53	

* Konfidensinterval anslået vha. Clopper-Pearson-metode.

Figur 37: DRFS efter risikogruppe for HER2-negative nodepositive (1-3 noder) patienter



Oversigt over data til Figur 37 DRFS efter risikogruppe for HER2-negative nodepositive (1-3 noder) patienter

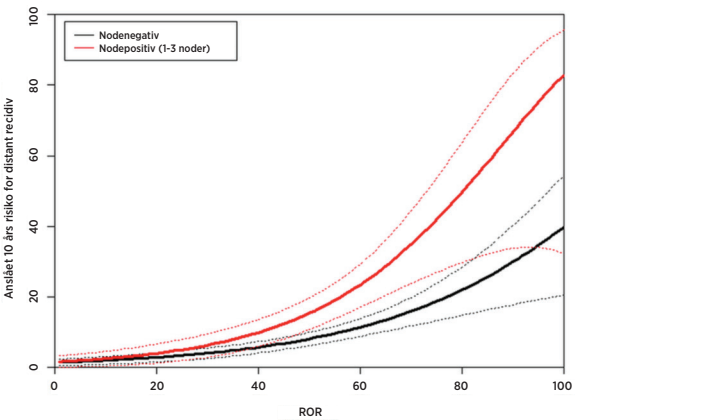
Risikogruppe	Antal patienter (%)	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Lav	15 (4 %)	0	100 % [78,2 % - 100 %]*
Mellem	142 (39 %)	7	93,6 % [86,8 % - 96,9 %]
Høj	210 (57 %)	43	76,1 % [69,0 % - 81,8 %]
Total	367 (100 %)	50	

* Konfidensinterval anslået vha. Clopper-Pearson-metode.

Forhold mellem ROR og risikofordisigelse

Figur 38 viser 10-års risikoen for distant recidiv som en funktion af ROR-resultat med 95 % konfidensintervaller, der er baseret på separate Cox-proportionale faremodeller for hver af de nodenegative og nodepositive (1-3 positive noder) patientgrupper. For de nodepositive (1-3 noder) patienter blev antagelsen om proportionale farer overtrådt ved montering på tværs af hele området. Kurven, der vises her for de nodepositive (1-3 noder) patienter, bruger nodepositive (1-3 noder) patienter med ROR-resultater i området 0-80, for hvilke antagelsen om proportionale farer blev opfyldt.

Figur 38: 10 års anslået DR-risiko efter nodalkategori med 95 % konfidensintervaller



I hver undergruppe var den absolutte kliniske risiko for de patienter, der var tildelt lavrisikokategorien, væsentligt forskellig fra den absolutte kliniske risiko for de patienter, der var tildelt højriskikategorien.

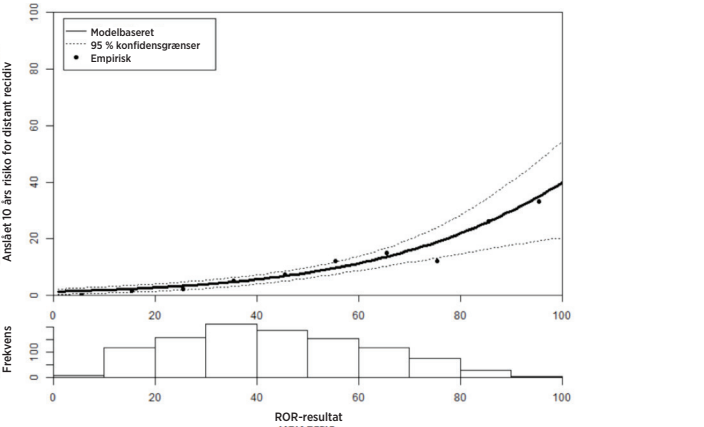
Tabel 34 viser fordelingen af nodenegative patienter efter 10-enheds ROR-beholdere. Desuden vises 10 års DR-risiko.

Tabel 34: Fordeling af nodenegative patienter efter 10-enheds ROR-område

ROR-område	Antal patienter	Procent af patienter	10 års DR-risiko (empirisk)
1-10	7	0,7 %	0,0 %
11-20	116	11,1 %	1,8 %
21-30	155	14,8 %	2,5 %
31-40	209	20,0 %	5,1 %
41-50	183	17,5 %	7,5 %
51-60	152	14,5 %	12,1 %
61-70	116	11,1 %	15,0 %
71-80	77	7,4 %	12,3 %
81-90	28	2,7 %	26,1 %
91-100	4	0,4 %	33,3 %
Total	1.047	100 %	

Figur 39 viser den modelbaserede kurve for de nodenegative patienter sammen med de empirisk anslåede 10-års overlevelsesfrekvenser for de 10 beholdere, hvor hver beholder består af alle patienter i 10-enheds ROR-områderne (1-10, 11-20 osv.). Under kurven findes et histogram, der viser frekvensfordelingen efter beholder.

Figur 39: Sammenligning af modelbaserede og empiriske estimater af 10-års distant recidiv-risiko for nodenegative patienter med fordelingen af ROR-resultater er vist nedenfor.



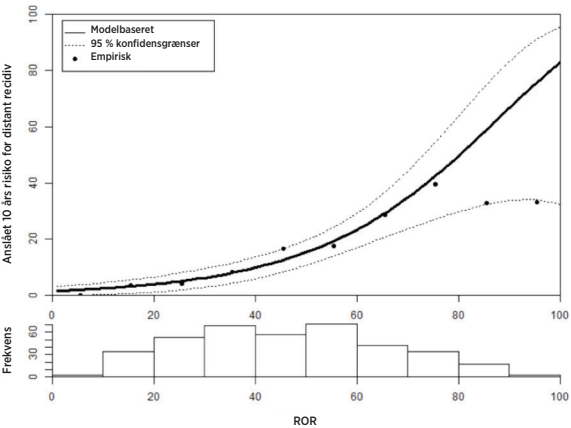
For de nodenegative patienter var de modelbaserede estimater af proportionale farer tilsvarende til de empiriske estimater på tværs af hele området. Tabel 35 viser fordelingen af nodepositive patienter (1-3 noder) efter 10-enheds ROR-beholdere. Desuden vises 10 års DR-risiko.

Tabel 35: Fordeling af nodepositive (1-3 noder) patienter efter 10-enheds ROR-område

ROR-område	Antal patienter	Procent af patienter	10 års DR-risiko (empirisk)
1-10	3	0,8 %	0,0 %
11-20	34	8,9 %	3,6 %
21-30	53	13,9 %	4,1 %
31-40	68	17,8 %	8,5 %
41-50	57	14,9 %	16,7 %
51-60	71	18,6 %	17,8 %
61-70	42	11,0 %	28,9 %
71-80	34	8,9 %	39,5 %
81-90	17	4,5 %	33,0 %
91-100	3	0,8 %	33,3 %
Total	382	100 %	

Figur 40 viser den modelbaserede kurve (ud fra nodepositive (1-3 noder) patienter med ROR-resultater ≤ 80) for de nodepositive patienter (1-3 noder) sammen med de empirisk anslåede 10-års overlevelsesfrekvenser for de 10 beholdere, hvor hver beholder består af alle patienter i de 10 ROR-områder (1-10, 11-20 osv.). Under kurven findes et histogram, der viser frekvensfordelingen efter beholder.

Figur 40: Sammenligning af modelbaserede og empiriske estimater af 10-års distant recidiv-risiko for nodepositive (1-3 noder) patienter med fordelingen af ROR-resultater er vist nedenfor.



Både Tabel 35 og Figur 40 viser den udjævning af den observerede 10-års risiko i toppen af ROR-området, som førte til, at antagelsen om proportionale farer ikke holdt stik. Der skal dog bemærkes, at prøvestørrelserne i de to beholdere over 80 begge var små for de nodepositive patienter (1-3 noder) (17 patienter fra 81-90 og kun 3 fra 91-100).

Sammenligning af intrinsiske Luminal A- og Luminal B-undertyper

Hovedparten af forsøgspersoner i undersøgelsen (96 %) var enten Luminal A eller Luminal B, hvilket ikke var uventet, da disse intrinsiske undertyper dominerer hos hormonreceptorpositive patienter¹².

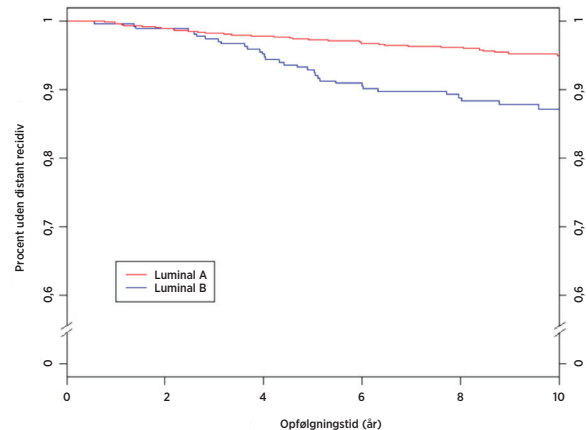
Tabel 36 viser resultaterne af sandsynlighedsforholdstesten til visning af yderligere prognostisk værdi for DRFS, som Luminal A/Luminal B-sondringen tilføjer ud over CTS. Tabellen viser også fareforholdet mellem Luminal A- og Luminal B-patienter. Der var en signifikant lavere risiko for distant recidiv for Luminal A-patienter i alle tre grupper.

Tabel 36. Sandsynlighedsforholdstest for prognostisk værdi for DRFS for luminal undertyper

Undergruppe	Antal patienter	Antal begivenheder	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-værdi	Fareforhold for LumA: LumB (95 % CI)
Alle	1.422	135	24,42	<0,0001	0,42 [0,30 – 0,59]
N0	1.009	74	9,68	0,0019	0,47 [0,30 – 0,75]
N+(1-3)	366	51	14,94	0,0001	0,33 [0,19 – 0,58]

Figur 41 viser en sammenligning af DRFS efter luminal undertype for nodenegative patienter, og Figur 42 viser samme sammenligning for nodepositive patienter (1-3 noder). I begge grupper var der betydelige forskelle mellem DRFS for Luminal A- og Luminal B-patienter.

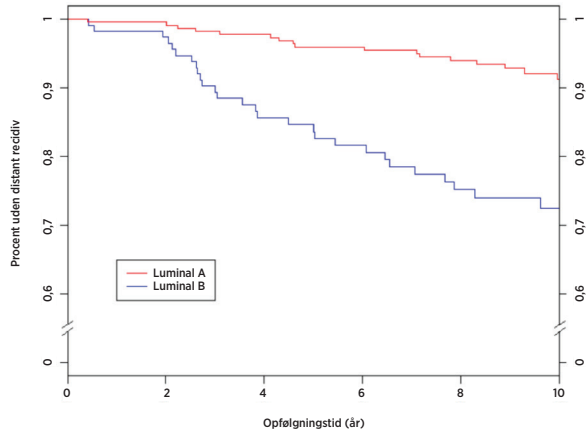
Figur 41: Kaplan-Meier-kurver for DRFS efter intrinsisk undertype for nodenegative patienter



Oversigt over data i Figur 41: Kaplan-Meier-kurver for DRFS efter intrinsisk undertype for nodenegative patienter

Risikogruppe	Antal patienter	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Luminal A	725	32	95,1 % [93,4 % - 96,3 %]
Luminal B	284	32	87,2 % [83,2 % - 90,3 %]
Total	1.009	64	

Figur 42: Kaplan-Meier-kurver for DRFS efter intrinsisk undertype for nodepositive (1-3 noder) patienter



Oversigt over data i Figur 42: Kaplan-Meier-kurver for DRFS efter intrinsisk undertype for nodepositive (1-3 noder) patienter

Risikogruppe	Antal patienter	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
Luminal A	248	17	91,3 % [87,2 % - 94,2 %]
Luminal B	118	28	72,5 % [64,2 % - 79,1 %]
Total	366	45	

Tabel 37 viser en tabel over 10-års RFS-frekvenser efter luminal undertype for de nodenegative og nodepositive (1-3 noder) nodalgrupper.

Tabel 37: 10 års RFS-frekvenser efter nodalgruppe og luminal undertype

Nodestatus	Luminal undertype	Antal patienter (%)	Antal begivenheder i løbet af 10 år	Anslået procent uden distant recidiv ved 10 år [95 % CI]
N0	Luminal A	725 (72)	44	93,0 % [91,1 % - 94,5 %]
	Luminal B	284 (28)	44	82,2 % [77,6 % - 85,9 %]
N+(1-3)	Luminal A	248 (68)	21	89,1 % [84,7 % - 92,4 %]
	Luminal B	118 (32)	30	71,6 % [62,2 % - 77,4 %]

For både de nodenegative og nodepositive (1-3 noder) patientpopulationer var forskellen mellem Luminal A- og Luminal B-patienter signifikant.

Konklusioner af klinisk undersøgelse 2

ROR blev demonstreret at tilføje betydelig prognostiske oplysninger ud over de kliniske og behandlingsmæssige standardvariabler, både når de blev inkluderet som en kontinuerlig måling, og når de blev inkluderet vha. tre foruddefinerede risikogrupper. Lavrisikogruppen havde 10-års DRFS klart over 90 %, som forventet. Højrisikogruppen havde 10-års DRFS på 80 %, hvilket var højere end forventet. Den var forventet at være demonstrerbart lavere end 80 %. De afskæringer, der blev brugt til at definere risikogrupper, var baseret på TransATAC-kohorten, der har højere risiko end den aktuelle kohorte, hvilket fører til en "højrisikogruppe" med samlet lavere risiko end forventet. ROR (kontinuerlig og risikogruppebaseret) viste lignende prognostiske oplysninger i forskellige undergrupper. Den kontinuerlige risikomodel passer nøje til de empiriske frekvenser for recidiv hos både nodenegative og nodepositive (1-3 noder) patientpopulationer. De fleste patienter (96 %) i undersøgelsen havde tumorer af én af to luminal undertyper (Luminal A eller Luminal B). I alle nodalstatusgrupper bidrog Luminal A/Luminal B-sondringen med yderligere prognostiske oplysninger angående DRFS.

Opsummering af kombinerede kliniske undersøgelser

Resultaterne kan generaliseres til distribueret brug, fordi prøver blev sendt til og analyseret på forskellige laboratorier i de to kliniske valideringsundersøgelser. ROR blev demonstreret at tilføje betydelig prognostiske oplysninger for 10 års DRFS ud over de kliniske og behandlingsmæssige standardvariabler, både når de blev inkluderet som en kontinuerlig måling, og når de blev inkluderet vha. tre foruddefinerede risikogrupper. Desuden tilføjede ROR ved en post-hoc-analyse betydelige oplysninger for DRFS efter 5 år ud over de kliniske standardvariabler for alle patienter. ROR (kontinuerlig og risikogruppebaseret) viste lignende prognostiske oplysninger i forskellige undergrupper. Der blev også udført begrænsede analyser vha. RFS. ROR-klasserne kunne også definere tre risikogrupper med distinkt RFS. I begge undersøgelser var der betydelige forskelle mellem DRFS for Luminal A- og Luminal B-undergrupperne uafhængigt af nodalstatus.

17 BIBLIOGRAFI

1. Geiss G, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs Nature Biotechnology 2008; 26: 317-25.
2. Parker JS, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. Journal of Clinical Oncology 2009, 27(8): 1160-1167.
3. Dowsett M, et al. on behalf of the ATAC and LATTE Trialists Group. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. Journal of Clinical Oncology. J Clinical Oncology. 2013 Aug 1;31(22):2783-90.
4. Nielsen TO, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor positive breast cancer. Clinical Cancer Research 2010; 16: 5222-5232.
5. Harris JR, et al. (Carey L, Perou C) Diseases of the Breast 4th edition. 2009: 458-471.
6. Baker SC, et al. The External RNA Controls Consortium: a progress report. Nature Methods 2010; 2: 731-734.
7. Tholen DW, et al. CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition. Clinical Laboratory Standards Institute. Volume 24.
8. Sestak I, et al. Prediction of Late Distant Recurrence After 5 Years of Endocrine Treatment: A Combined Analysis of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the PAM50 Risk of Recurrence Score. Journal of Clinical Oncology 2014; Oct 20 ePub ahead of print JCO.2014.55.6894.
9. Cuzick J, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. Lancet Oncology 2010; 11(12):1135-41.
10. Dubsy PC, et al. Tamoxifen and Anastrozole As a Sequencing Strategy: A Randomized Controlled Trial in Postmenopausal Patients With Endocrine-Responsive Early Breast Cancer From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Journal of Clinical Oncology 2012;30(7): 722-728.
11. Dowsett M, et al. Prediction of Risk of Distant Recurrence Using the 21-Genes Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study. Journal of Clinical Oncology 2010; 28: 1829-1834.
12. Cuzick J, et al. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health® Recurrence Score in Early Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology 2011; 29: 4273-4278.

13. (a) Jakesz R, Jonat W, Gnant M, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: Combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. Lancet 2005; 366(9484): 455-462.
- (b) Jonat W, Gnant M, Boccard F, Kaufmann M, Rubagotti A, Zuna I, Greenwood M, Jakesz R: Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis. Lancet Oncology 2006; 7(12): 991-996.
- (c) Gnant M, Filipits R, Greil H, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. Annals of Oncology 2014; 25(2):339-45.

18 SYMBOLER OG DEFINITIONER



– Producent



– Autoriseret repræsentant i EU.



– Medicinsk enhed til *in vitro*-diagnosticering



– Se Brugervejledningen



– CE-mærke



– Batchkode/partnummer



– Katalog- eller referencenummer



– Indeholder tilstrækkeligt til <n> test



– Temperaturområde for opbevaringsbetingelser



– Nederste temperaturgrænse for opbevaringsbetingelser



– Øverste temperaturgrænse for opbevaringsbetingelser



– Skal bruges inden/udløbsdato



– Opad

Room Temp. = Stuetemperatur

HYB = Hybridisering

Ansvarsfraskrivelse

Til *in vitro*-diagnostisk brug.

© 2025 Veracyte, Inc. og associerede selskaber. Alle rettigheder forbeholdes. Veracyte, Veracyte-logoet, Prosigna og Prosigna-logoet er varemærker tilhørende Veracyte, Inc. og dets associerede selskaber. nCounter er et varemærke tilhørende NanoString Technologies, Inc. og anvendes på licens.

19 KONTAKTOPLYSNINGER

 Kontaktoplysninger i USA:
Veracyte, Inc.
6000 Shoreline Court
Suite 300
South San Francisco CA 94080
USA
Telefon: +1-650-243-6335
www.veracyte.com



Autoriseret repræsentant i EU:
Veracyte Global, B.V.
Fascinatio Boulevard 216
3065WB Rotterdam
NETHERLANDS

Globale kontaktoplysninger:
E-mail til teknisk support: DxSupport@Veracyte.com
E-mail til produktoplysninger: info@prosigna.com
Websted: www.prosigna.com